

Spécificité et mécanisme d'action de l'apyrase.
Application à la préparation des acides
adénosine-diphosphorique et 5-monophosphorique.

THÈSE

présentée à la Faculté de Pharmacie

de l'Université de Paris

par

Madame NGUYÊN-NHƯ-KIM

née TRẦN-THI-ÂN

pour obtenir le titre

de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Mention PHARMACIE)

soutenue le 12 Juillet 1954 devant la Commission d'examen

MM. FLEURY, Président

COURTOIS

CAVIER

Assesseurs

**Spécificité et mécanisme d'action de l'apyrase.
Application à la préparation des acides
adénosine-diphosphorique et 5-monophosphorique.**

THÈSE

présentée à la Faculté de Pharmacie

de l'Université de Paris

par

Madame NGUYÊN-NHŨ-KIM

née TRÂN-THI-ÂN

pour obtenir le titre

de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Mention PHARMACIE)

soutenue le 12 Juillet 1954 devant la Commission d'examen

MM. FLEURY, Président

COURTOIS { **Assesseurs**
CAVIER }

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. René FABRE	Doyen, C. *, * I.
R. DELABY	Assesseur, O. *, * I.
G. CUVIER	Secrétaire Général, * I.
L. JEANDEL	Secrétaire, * I.
E. BUVAT	Commis, * I.
A. QUILLIOT	Rédacteur.
Mlle M. DENNY	Commis.
Mme M.-L. ESPINASSE	Rédactrice, * A.

PROFESSEURS

MM. FABRE, C. *, * I.	Toxicologie.
DELABY, O. *, * I.	Pharmacie chimique.
FLEURY, *, * I.	Chimie biologique.
PICON, O. *, * I.	Chimie minérale.
MASCRE, *, * I.	Botanique.
JANOT, *, * I.	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, *, * I.	Chimie organique.
VALETTE, *, * I.	Pharmacodynamie.
BEDEL, *, * I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS, *, * A.	Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
GUILLOT, *, * A.	Physique.
GAUTIER, *, * I.	Chimie analytique.
LAMBIN (Melle), * I.	Microbiologie.
RAOUL, * A.	Zoologie appliquée.
DOMANGE, *, * I.	Professeur à titre personnel.
COURTOIS, *, * A.	Professeur à titre personnel.
CRETE, * A.	Professeur sans Chaire.
MORETTE, *, * A.	Professeur sans Chaire.
CAVIER, * I.	Professeur sans Chaire.
TRUHAUT, *, * I.	Professeur sans Chaire.
Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, C. *, * I., et	
LEBEAU, C. *, * I.,	
Membres de l'Institut.	
BOUGAULT, C. *, * I.	
HERISSEY, C. *, * I.	
LAUNOY, O. *, * I.	

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. MOREAU, * A.	Sciences physiques et chimiques.
GUY	Sciences physiques et chimiques.
GERMAIN, * A.	Sciences naturelles.
N	Sciences naturelles.
N	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. CORRIEZ, * I.	Physique.
HARISPE, * A.	Chimie générale et pharmaceutique.
DEYSSON	Botanique.
GIRARD, * A.	Chimie biologique.
MANGEOT, * A.	T. P. 4 ^e année.
PIETTE, * A.	Biologie animale.
RENAULT H., * A.	Chimie analytique.
DESVIGNES	Microbiologie.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL, * A.	Pharmacotechnie galénique.
QUEVAUVILLIER, * A.	Pharmacodynamie.
WAROLIN	Pharmacotechnie chimique.

BIBLIOTHÈQUE

Conservateur : M. GARNIER, *, * I.
Bibliothécaires : Melle LAVAUD, * I., Mme KREHMER.

A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

J'adresse mes respectueux remerciements

à Monsieur le Professeur FLEURY

qui a bien voulu me faire l'honneur
de présider cette thèse.

à Monsieur le Professeur COURTOIS

pour la bienveillante attention avec
laquelle il a examiné ce travail.

à Monsieur le Professeur CAVIER

qui a bien voulu faire partie de mon
jury de thèse.

A MON MAITRE, Monsieur le Professeur J. ROCHE

en témoignage de ma sincère gratitude
et de mon plus profond respect.

A Monsieur NGUYÊN-VAN-THOAI,

dont les conseils m'ont été bien
précieux au cours de ces recherches,
toute ma reconnaissance.

A MES CAMARADES du LABORATOIRE de BIOCHIMIE GENERALE
et COMPAREE du COLLEGE DE FRANCE,

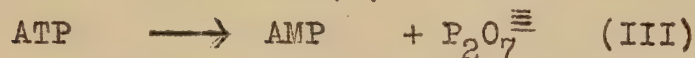
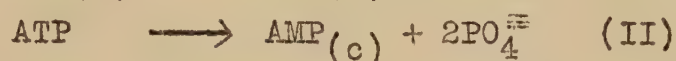
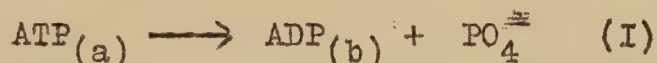
en souvenir du sympathique accueil
que j'ai reçu.

INTRODUCTION

SPECIFICITÉ DE L'APYRASE

A/ - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GROUPEMENTS PHOSPHORIQUES LABILES
de L'ACIDE ADENOSINE TRIPHOSPHORIQUE

Les trois groupements phosphoriques labiles de l'acide Adénosine triphosphorique (ATP) peuvent être hydrolysés suivant trois types de réaction :



La première réaction est catalysée par l'Adénosine triphosphatase, la deuxième par l'Apyrase_(d) et la troisième par un enzyme nouvellement découvert qui n'a pas encore reçu d'appellation.

I - LOHMANN, le premier, a précisé la spécificité de l'Adénosine triphosphatase par rapport, non seulement au substrat initial, mais également aux produits d'hydrolyse formés. Il montra que les homogénéisats de muscle d'écrevisse débarrassés des phosphatases par plusieurs lavages hydrolysaient un seul groupement phosphorique de l'ATP et l'ADP formé a pu être isolé (47). L'intérêt porté à cet

- {a} ATP : acide Adénosine triphosphorique
- {b} ADP : acide Adénosine diphosphorique
- {c} AMP : acide Adénosine monophosphorique
- {d} Apyrase : nom suggéré par Meyerhof en 1945 pour décrire les adénylphosphatases qui hydrolysent à la fois l'ATP et son produit de dégradation l'ADP, libérant successivement les 2 groupements phosphoriques labiles et donnant naissance à l'AMP.

enzyme acquit une importance nouvelle par la découverte d'ENGELHARDT montrant son association avec la myosine purifiée et son rôle possible au cours de la contraction musculaire (21).

L'ADP libéré sous l'action de l'Adénosine triphosphatase est reconvertie en ATP, soit par dismutation ($2 \text{ ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$) sous l'action de l'acide adényliquinase (myokinase) (17), soit par transphosphorylation en présence de créatine-phosphate, grâce à la créatine-kinase, laquelle est associée à l'actine (46).

II - L'hydrolyse de deux groupements phosphoriques labiles de l'ATP est elle-même réalisée par des préparations solubles de muscles. L'activité enzymatique attribuée à une Adénylpyrophosphatase (47) fut retrouvée par ENGELHARDT et LYUBIMOVA (20). Ces auteurs montrèrent que les extraits bruts de myosine hydrolysaient à la fois, les deux groupements phosphoriques labiles de l'ATP, tandis que la myosine reprécipitée trois fois attaquait seulement le groupement phosphorique terminal. Ils en conclurent à l'existence d'un nouvel enzyme, "l'Adénylpyrophosphatase", soluble dans l'eau et différente de la myosine (20). Cependant la formation de l'acide adénosine-5-monophosphorique (AMP) par les extraits musculaires ne semble pas dépendre d'une hydrolase, mais d'une dismutase agissant sur l'ADP (34) :

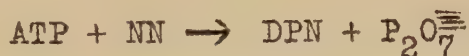


L'hydrolyse simultanée de l'ATP et l'ADP est réalisée par des préparations de foie (45, 9, 34) et de levure (50), renfermant un enzyme auquel MEYERHOF donna le nom d'Apyrase.

Il est caractérisé par le fait qu'il hydrolyse à la fois l'ATP et son premier produit de dégradation, l'ADP, libérant successivement les deux groupements phosphoriques labiles, et donnant finalement naissance à l'AMP. En fait, ni les préparations de KALCKAR, ni celles de MEYERHOF ne sont exemptes de nucléo-phosphatase et l'AMP formé est partiellement hydrolysé à son tour en adénosine et acide phosphorique.

III - L' ATP peut subir un troisième mode d'hydrolyse, en donnant naissance à l'AMP et à l'acide pyrophosphorique. La réaction catalysée par des préparations de venins de serpents et d'os découverts par HITCHINGS et FULLER (32) fut confirmée par ZELLER (78). L'enzyme, présent également dans le foie de lapin, a été purifié, à partir du liquide séminal et séparé de l'ATPase acide et alcaline. Son pH optimum est de 8,4 - 9,9. Il est insensible aux ions Ca^{++} et Mg^{++} (30, 31). Son mécanisme d'action le différencie des enzymes de KORNBERG (38). En effet, cet enzyme libère l'acide pyrophosphorique à partir de l'ATP en présence de

l'eau, tandis que les derniers réalisent une dismutation de l'ATP en présence des Ribosides pyridiniques ou flaviniques. Ceux-ci se combinent à l'AMP pour donner naissance au dinucléotide pyridinique ou flavinique, et l'acide pyrophosphorique est libéré.



En résumé, l'ATPase et l'enzyme des venins de serpents présentent une spécificité bien définie : le premier agissant sur l'ATP seul et hydrolysant le groupement phosphorique terminal, le second étant actif uniquement sur l'ATP et libérant le groupement pyrophosphorique.

Des trois enzymes examinés, l'Apyrase présente une double spécificité agissant à la fois sur l'ATP et l'ADP. C'est ce caractère qui retient notre intérêt.

B/- BIOCHIMIE DE L'APYRASE -

I - CARACTERES ENZYMATIQUES

Les traits les plus caractéristiques d'un enzyme non isolé à l'état pur étant son pH optimum et son comportement vis-à-vis de l'action des divers effecteurs, nous nous attacherons en premier lieu à rapporter les différents pH optima signalés pour l'Apyrase, qui semblent varier considérablement avec sa répartition et les conditions d'extraction;

ensuite, nous essaierons de classer les divers produits considérés jusqu'ici par les auteurs comme activateurs ou inhibiteurs de cet enzyme.

pH Optimum

1) Dans les tissus végétaux le caractère le mieux défini de l'Apyrase semble être son pH optimum, situé entre 5,5 et 6,5. L'activité apyrasique de l'extrait brut de pomme de terre, ainsi que celle de l'Apyrase soluble purifiée et l'Apyrase insoluble partiellement purifiée de KRISHNAN (40), se comportent d'une façon identique à l'égard de ce pH optimum. Elle décroît très rapidement à une plus forte alcalinité.

De même, l'enzyme extrait du mycelium de *Penicillium Chrysogenum* (41, 42) possède un optimum d'action à pH = 6.

Signalons qu'un enzyme extrait - et partiellement purifié par précipitation au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et fractionnement à l'acétone - à partir des patates par des auteurs japonais (77) agit à un pH plus bas (pH = 4,7). Mais cette préparation catalyse aussi l'hydrolyse du pyrophosphate minéral et il convient plutôt de la considérer comme un mélange de pyrophosphatase et d'Apyrase.

2) Contrairement à celui des moisissures, le pH optimum trouvé chez les bactéries se rapproche nettement de

l'Apyrase des tissus animaux (61). L'activité Apyrasique maxima se situe entre $\text{pH} = 9$ et $\text{pH} = 9,5$. Elle diminue très rapidement à un pH plus élevé et plus lentement à un pH inférieur. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle le pH physiologique choisi par l'auteur pour ses expériences est de préférence 8,1 (véronal 0,05 M).

3) C'est cependant dans les tissus animaux que nous pouvons constater des écarts importants. En effet, si la valeur de $\text{pH} = 9$ est retrouvée, par exemple dans les extraits de rétine de lapin (10), ou d'aorte d'homme et de boeuf (5), l'existence de plusieurs pH optima a été signalée dans divers tissus. Ainsi MARION B.R. GORE trouve 2 pH optima (7,4 et 8,2) pour l'activité apyrasique de cerveau (26).

Les tissus de Grenouille traités avec du tampon au véronal 0,1 M de pH 7,4 ont pour pH optimum 7,4 à la température optima de 45° ; les extraits au KCl 0,7 M (tampon véronal 0,1 M de pH 7,6) ont 3 pH optima à la température optima de 30° (9,2 - 7,8 - 6,3); ceux au NaCl 10 % (véronal 0,1 M de pH 6,8) ont pour pH optimum 6,8 à la température optima de 30° (23).

Rappelons aussi les valeurs établies par S. FRANK, R. LIPSHITZ et L.G. BARTH (24) pour l'Apyrase des oeufs de Grenouille (4 - 9) : des globules rouges de Poussin (5,5 - 7 - 8) et du plasma de Poussin (4,5 - 9).

Les différences de pH relevées peuvent tenir sans doute à l'origine des protéines enzymatiques et aux légères

différences de structure qui les caractérisent. Le fait a été déjà observé pour d'autres enzymes, en particulier pour les phosphatases isodynamiées d'origine animale ou végétale (58, 65). Mais, dans le cas présent, ces différences peuvent tenir également à la présence d'impuretés protéiques modifiant les conditions d'ionisation de l'enzyme dans les préparations enzymatiques brutes utilisées.

Action des effecteurs

1.- Cations -

Dans ce domaine non plus, les caractères de l'Apyrase ne sont pas nettement définis.

A.- Ca^{++} . - Cet ion est un activateur de l'Adénosine triphosphatase associée avec la Myosine (22) et son activité activatrice a été considérée comme permettant de différencier les systèmes ATPasiques (12). En ce qui concerne l'activité apyrasique, KRISHNAN (40) observe que ses préparations enzymatiques de pomme de terre sont fortement activées en présence des ions Ca^{++} .

Ce point de vue a été contesté par NGUYEN VAN THOAI, ROCHE et SALTMAN (66), car l'Apyrase spécifique de l'ATP qu'ils ont pu isoler de la même source s'est montré insensible à l'action du Chlorure de calcium.

Une autre Apyrase localisée dans les granules cyto-

plasmiques de l'embryon de Poussin, révèle la même indifférence vis-à-vis de Ca^{++} . Celle-ci ne se manifeste toutefois qu'à la neutralité. Si le pH s'élève à 9 ou plus haut, Ca^{++} possède au contraire un effet activateur très prononcé sur l'activité apyrasique (71). Il semble d'ailleurs, à quelques exceptions près, qu'en général les Apyrases animales se comportent à peu près comme celle de muscle et sont activées par Ca^{++} , tandis que les Apyrases des bactéries (61), des moisissures (41, 42) et des végétaux sont, au contraire, inhibées par cet ion.

B.- Mg^{++} . - Les résultats obtenus sont assez voisins de ceux traduisant l'action de l'ion Calcium. L'Apyrase de levure est insensible à Mg^{++} ; celui-ci exerce, par contre, un effet inhibiteur vis-à-vis de l'enzyme des moisissures et se montre plutôt activateur de ceux extraits des bactéries et des tissus animaux (foie, cerveau, muscle, etc...). L'effet de Mg^{++} est considérée ici par les auteurs comme une réelle activation et non une catalyse de l'hydrolyse de l'ATP par les ions Mg^{++} , propriété dont s'est servie M. BIELSCHOWSKY pour préparer l'ADP à partir de l'ATP (11). Signalons que, si l'activité apyrasique des tissus nerveux est fortement activée par le Mg^{++} ($7,7 \times 10^{-3}$ M), elle est par contre inhibée en présence de quantités minimales de Ca^{++} (6×10^{-4} M). Il n'est pas possible d'interpréter ces effets

par l'action du Ca^{++} et du Mg^{++} sur les tissus nerveux. En effet, d'une part des faibles concentrations de Ca^{++} et de Mg^{++} dans le sang produisent l'hyperexcitabilité du système nerveux, d'autre part, l'anesthésie que provoque une forte augmentation du taux sanguin de Mg^{++} cesse lors de l'administration de sels de calcium.

C.- Autres Cations.- Mn^{++} est activateur de l'enzyme des levures (50), inhibiteur de celui des bactéries (61). Fe^{++} , Zn^{++} et Al^{+++} sont des inhibiteurs.

Quant à K^+ , il est considéré par M.B. GORE (26) comme activateur au même titre que Mg^{++} vis-à-vis de l'Apyrase du cerveau. Cette observation est cependant difficile à concilier avec les suggestions de H.F. UTTER (75) et de J.A. MUNTZ et J. HURWITZ (56), qui considèrent que l'antagonisme apparent entre Na^+ et K^+ ou $(\text{NH}_4)^+$ vis-à-vis de la glycolyse dans les préparations de muscle de cerveau, ou de levure est dû aux effets spécifiques de ces ions à différents stades de ce processus. D'après ces auteurs, Na^+ stimule les enzymes catalysant la dégradation de l'ATP (c'est-à-dire l'ATPase ou l'Apyrase), inhibe les transphosphorylases (c'est-à-dire les enzymes amenant le groupement phosphorylé à l'acide adénylique ou à l'Adénosine diphosphate). K^+ ou $(\text{NH}_4)^+$ agit donc sur les transphosphorylations en maintenant une concentration de l'ATP, grâce à laquelle la glycolyse peut évoluer normalement; ils ne seraient pas néces-

saires si l'ATP se trouvait en grande concentration dans le milieu.

2.- Effet d'autres substances -

L'Apyrase est, comme l'ATPase, sensible à de faibles concentrations de divers produits agissant sur les groupements thiols pour s'y combiner ou les oxyder (Cu^{++} , Iodocétate, Alloxane). L'inhibition est alors, dans le cas des seconds, réversée par des réducteurs, tels que la Cystéine, le Glutathion, les Cyanures.

De même, l'effet activateur des acides aminés sur les enzymes catalysant la dégradation de l'ATP est bien connue. Selon BAILEY, l'amino-acide élimine les métaux lourds inhibiteurs (Cu, Ag), protège l'enzyme contre les effets thermiques, et doit, en plus, exercer une action spécifique due à sa nature dipolaire. Il est d'ailleurs habituel de mesurer l'activité de l'Apyrase dans un tampon constitué par une solution d'acide aminé (Histidine).

D'autres facteurs peuvent produire l'activation de l'Apyrase. M. B.R. GORE rapporte que le Coenzyme A ($\text{CH}_3\text{-Co-SR}$) exerce à l'état brut un effet très marqué sur l'action enzymatique, alors que son action est beaucoup moins forte à l'état purifié.

Les Citrates et les Oxalates alcalins, qui agissent à la concentration de 0,01 M, peuvent être cités comme inhibiteurs (61).

3.- Action de la chaleur -

L'Apyrase de la bactérie thermophile n° 2184 (27) est stable à 65° C, température de choix pour la croissance de ces organismes dont l'enzyme présente comme énergie d'activation 9600 Calories/molécule et dont la Constante de MICHAELIS est de 0,00065 à 60°.

L'Apyrase de bactéries mésophiles (B. subtilis) est moins résistante à la chaleur.

Une extrême instabilité à l'égard de celle-ci a été mentionnée par MEYERHOF avec l'Apyrase de levure (50) et par BARTH et JAEGER avec l'Apyrase d'oeuf de Grenouille (7). L'enzyme est même trop instable pour être isolé à la température ambiante.

Une Apyrase trouvée dans les extraits de muscle par ENGELHARDT (22) est complètement détruite à 50° au bout de 30 minutes.

L'Apyrase provenant des pommes de terre est rapidement inactivée par la chaleur en l'absence d'ATP.

II - CHIMIE PHYSIOLOGIQUE DE L'APYRASE

1) Répartition.-

L'Apyrase se distingue de l'ATPase, non seulement par la nature des produits de son action, mais aussi par sa répartition biologique (Tableau 1). Alors que l'ATPase est

TABEAU I - REPARTITION BIOLOGIQUE DE L'APYRASE

Origine	pH Optimum	Sensibilité aux effecteurs	Hydrolyse AMP(+) ou non (-)	Références
Pomme de terre	5,5 - 6,5 6,3	Ca ⁺⁺ activateur Ca ⁺⁺ indifférent	+ -	(30 - 40) (66)
Jus de citron	?	Mg ⁺⁺ activateur Hespérine inhibiteur	+	(2)
Moisissures	6	Ca ⁺⁺ et Mg ⁺⁺ inhibiteurs	?	(41 - 42)
Levure	6	Mn ⁺⁺ activateur Ca ⁺⁺ inhibiteur Mg ⁺⁺ indifférent	+	(50)
Bactéries	9 - 9,5	Mg ⁺⁺ activateur Ca ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Fe ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ , Al ⁺⁺⁺ inhibiteurs Citrate, oxalate inhibi- teurs Fluorure indifférent	?	(61)
Embryon (granules cytoplasmiques)	7,2	Ca ⁺⁺ indifférent (à pH neutre) Nitrite inhibiteur	?	(72)
Oeuf	8,8 - 9,2	Ca ⁺⁺ activateur	?	(6,16,55)
Foie	7,97	Mg ⁺⁺ activateur	+	(34)
Cerveau	7,4 - 8,2	Mg ⁺⁺ { activateur K ⁺ { 7,7 x 10 ⁻³ M	?	(26)
Muscle $\begin{cases} \nearrow \text{Insecte} \\ \searrow \text{Grenouille} \end{cases}$	8 6,2 - 6,9	Mg ⁺⁺ activateur Enzyme sol. dans l'eau inhibé par le Ca ⁺⁺ Enzyme insol. dans l'eau, sol. dans KCl, Activé par le Ca ⁺⁺	?	(28) (71)
Rétine	9,1	Mg ⁺⁺ activateur	+	(10, 76)
Aorte	9	se comporte comme l'Apy- rase de foie de Kalckar	+	(5)
Sérum humain	4,8 - 8,9		+	(49)
Glob. Rouges de Poussin	5,5 - 7 - 8	Mg ⁺⁺ activateur		(23)
Plasma de Poussin	4,5 - 9	Mg ⁺⁺ activateur		

prédominante dans les tissus animaux (12), l'Apyrase a surtout été signalée chez les Végétaux (2, 39, 40) et les moisissures (41, 42). Cependant, on observe aussi sa présence chez les Bactéries (61) et dans le foie (34), le cerveau (26), l'aorte (5), la rétine (10, 76). Les muscles de certains animaux (Grenouille, Rat) (71) et d'Insectes (28), renferment des enzymes détachant les deux groupements phosphorylés labiles de l'ATP. STEINBACH et MOOG (72) ont pu fractionner à partir des granules cytoplasmiques de l'embryon de Poussin l'ATPase et l'Apyrase, par de rapides centrifugations.

La localisation de l'activité apyrasique paraît d'ailleurs être fonction de la nature de la cellule. Dans l'oeuf d'Huître non fertilisé, l'Apyrase est à peu près également répartie entre le cytoplasme et les granules (16). Des oeufs intacts, fertilisés ou non, d'un Oursin (Arbacia), ne montrent pas d'activité apyrasique appréciable en surface, mais une pulpe d'oeufs fertilisés possède une activité enzymatique 20 fois supérieure à celle des oeufs intacts et une pulpe d'oeufs non fertilisés 9 fois plus. Dans les oeufs de Paracentrotus, l'action apyrasique semble associée aux granules protoplasmiques (55).

Les globules rouges nucléés de Poussin et de Grenouille (24), possèdent une activité apyrasique plus élevée que les globules anucléés de Rat et d'Homme. 90 % de l'activité

apyrasique des globules rouges de Poussin est localisée dans le noyau, alors que, dans le foie de Grenouille, l'enzyme se trouve principalement dans le cytoplasme.

Il est hors de doute qu'il existe une relation étroite entre l'activité apyrasique et la différenciation des structures durant la morphogénèse. BARTH et JAEGER (7), étudiant la différenciation du Symplesma viride-Stolonica, remarquent que cette Ascidie se reproduit asexuellement par bourgeonnement à partir d'un stolon, de manière qu'à des intervalles réguliers un zooïde se forme. Les extraits aqueux de stolon, représentant une masse de cellules indifférenciées, ne contiennent aucune activité apyrasique, alors que ceux du tissu différencié du Zooïde, se montrent très actifs.

De même, l'activité apyrasique varie avec le développement embryonnaire. Dans les extraits aqueux d'oeuf de Grenouille, elle augmente jusqu'au stade Gastrula et diminue ensuite. Les extraits (ClNa 9 ‰) sont moins actifs dans les premiers stades de développement que pendant le stade Gastrula, et leur activité ne diminue pas au stade Neurula (8).

L'activité apyrasique du Cortex cérébral du fœtus de cobaye (25) est, jusqu'au 42^e jour de gestation, constante et égale à 40 % environ de celle observée chez les jeunes adultes. Elle augmente ensuite rapidement jusqu'au

terme. Il en est de même pour le foie, qui, chez les adultes jeunes, est plus faible que chez des animaux âgés. Ce fait confirme à nouveau le rôle important que l'ATP joue dans le métabolisme cellulaire (18, 68) et celui des enzymes hydrolysant l'ATP dans l'économie (15, 48, 73).

2) Rôle de l'Apyrase -

Le taux de dégradation de l'ATP apparaît comme un facteur de régulation du métabolisme cellulaire, car le maintien du métabolisme des cellules intactes est lié à celui de leur teneur en ATP. La balance entre l'ATP et les produits de son hydrolyse peut être importante dans la régulation, non seulement de la glycolyse et de la respiration cellulaires, mais aussi du métabolisme des lipides et des protéides.

L'accélération de la glycolyse dans les tumeurs pourraient alors s'expliquer par une altération de la balance entre les Adénylpyrophosphates, altération résultant d'une élévation de la teneur en accepteurs de phosphates et provenant d'une augmentation de l'activité apyrasique, insuffisamment compensée par la phosphorylation oxydative (70).

Avec les cellules de levure intactes, les hexoses sont fermentés selon l'équation globale de GAY-LUSSAC :
$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$$
. La fermentation alcoolique continue ainsi rapidement jusqu'à ce que tout le Glucide soit métabolisé, et dans un tel système de fermentation,

la concentration du phosphate minéral n'est pas un facteur limitant. Mais, avec les extraits ou les jus de macération de Levure, la fermentation ne suit plus la réaction décrite; l'ose est alors métabolisé: selon l'équation de HARDEN et YOUNG : $2 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2 \text{CO}_2 + \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4(\text{PO}_4\text{Na}_2)_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$. Pour une molécule d'hexose consommée, une autre se trouve estérifiée en hexose diphosphate (HDP). Celui-ci s'accumule et fermente très lentement. Dans ces conditions, même si le glucose est présent en excès, la fermentation s'arrête dès que le milieu est épuisé en phosphate minéral.

La raison de ce fait a été donnée par MEYERHOF et ses collaborateurs (50, 52). Dans la levure vivante, l'excès d'ATP se formant au cours de la fermentation du glucose ne peut pas s'accumuler, mais est rapidement hydrolysé par l'Apyrase. Le phosphate minéral se trouve donc en quantité suffisante pour la formation de l'acide 1-3 diphosphoglycérique. Mais l'enzyme, très instable, se trouve détruite pendant la dessiccation de la levure ou inhibée par l'Urée, le Toluène. C'est pourquoi pendant la fermentation avec les extraits de levure, l'ATP s'accumule et le phosphate minéral disparaît. Si on ajoute à un extrait qui s'est arrêté de fermenter de l'Apyrase de pomme de terre, la fermentation est rapidement restaurée. Dans ces conditions, HDP est fermenté par l'extrait de levure et le taux de la

fermentation est comparable à celui observé en présence de phosphate minéral. L'Apyrase de pomme de terre catalyse l'hydrolyse des deux groupements phosphoriques labiles de l'ATP pour donner de l'AMP. L'addition d'une trop grande quantité d'enzyme à l'extrait de levure détruirait la totalité de l'ATP disponible. Il est donc clair que la présence de l'Adénosine triphosphatase dans les cellules vivantes de levure, ou l'addition de l'Apyrase à un extrait de levure maintient la balance entre la phosphorylation du glucose, à laquelle l'ATP est nécessaire, et la phosphorylation du 3-phosphoglyceraldéhyde, à laquelle le phosphate minéral est indispensable.

De même que le taux de la fermentation se trouve étroitement lié à l'activité apyrasique, dans les cellules de levure, de même la glycolyse peut être régularisée par cette activité enzymatique dans les tissus animaux intacts. (51, 53, 54).

Dans les extraits de cerveau, moins riches en enzymes hydrolysant l'ATP que les homogénats, l'addition d'accepteurs de phosphate devient nécessaire pour que l'oxydo-réduction conduise à la glycolyse.

Au cours des infections par bactériophages (A.B.Pardee) le transfert de l'énergie des réactions de fermentation et d'oxydation aux réactions de synthèse par l'intermédiaire de l'ATP pourraient être affectées par l'activité apyrasi-

que. PRICE (63, 64) a observé que les facteurs chimiques inhibant la formation de l'ATP empêchent aussi la production des bactériophages. Il en conclut que l'ATP est nécessaire pour ce dernier processus. L'activité apyrasique des cellules intactes n'est égale qu'au tiers de celle de l'extrait par mg de protéine, ce qui tient à l'imperméabilité des cellules intactes à l'ATP.

L'infection par les bactériophages sextuple l'activité apyrasique des cellules, probablement à cause du changement de perméabilité de celles-ci à l'ATP se produisant peu avant la lyse. Avec les extraits, on a d'abord une petite diminution au moment de l'infection, puis 30 % d'augmentation pendant la période où la teneur en phage intracellulaire augmente et, enfin, une diminution brusque lors de la lyse.

L'augmentation de l'activité enzymatique dans ces infections par bactériophages pourrait être due à une augmentation du taux de l'enzyme, ou à l'apparition d'une nouvelle réaction dans laquelle l'ATP serait utilisé pour phosphoryler un composé se dégradant, en libérant du phosphore minéral, ou à un déplacement d'un inhibiteur naturel de l'enzyme.

L'Apyrase joue probablement aussi un rôle important dans le métabolisme des moisissures (KRISHNAN). En effet, pendant une première phase de celui-ci, quand le glucose va être rapidement consommé, l'activité enzymatique et le

taux du phosphore labile sont très élevés; Quand l'autolyse se stabilise, il se produit un arrêt brusque et une disparition complète de l'activité apyrasique et du phosphore labile.

Enfin l'Apyrase peut jouer un rôle dans le développement des pommes de terre. KOTELNIKOVA (43), a étudié l'action de diverses conditions de croissance de celles-ci sur l'activité apyrasique dans les tubercules. Leur développement soit sur un sol riche, soit en engrais minéral et organique, soit en engrais minéral et non en engrais organique, soit dépourvu d'engrais, constate que l'activité apyrasique des pommes de terre augmente au cours de la croissance, quel que soit le milieu employé. Un taux plus élevé toutefois est observé dans les tubercules au cours de leur formation sur des milieux dépourvus d'engrais; mais l'activité est en général comparable dans les trois cas lorsque les tubercules sont mûrs.

En conclusion, à l'exception du cerveau et des muscles - où l'on ne sait pas si l'existence de l'activité enzymatique est due à une "Apyrase" proprement dite ou à une combinaison de plusieurs enzymes différents, dont l'ATPase - nous constatons la présence de l'Apyrase exclusivement dans les végétaux, les moisissures, les bactéries et surtout dans les tissus animaux dont l'Adénosine-triphosphatase est absente : foie, intestin, oeuf etc... Comme l'ATPase, et

suppléant à cet enzyme dont l'action sur l'ATP est moins étendue et moins énergique, l'Apyrase paraît jouer dans les autres organes le rôle d'un dispositif de sécurité destiné à maintenir constant un certain niveau d'énergie, et, par conséquent, un certain rythme du métabolisme.

C/- CONCLUSION et BUT DE RECHERCHES -

La double spécificité de l'Apyrase, sa répartition étendue dans le monde végétal et animal, la place prédominante qu'elle occupe dans la régulation énergétique du métabolisme des tissus, méritent à tous égards l'intérêt qui se porte sur l'étude de cet enzyme. Mais les caractères mêmes de celui-ci ne sont pas encore bien définis, car les Apyrases connues jusqu'ici se montrent différentes en ce qui concerne leur pH optimum, leur stabilité, leur sensibilité aux effecteurs. Cette divergence des résultats obtenus peut tenir à la présence d'impuretés protéiques dans les préparations enzymatiques utilisées; elle peut, d'autre part, être due à des confusions, très souvent commises par les auteurs, en ce qui concerne la terminologie de l'Apyrase et de l'Adénosine-triphosphatase.

La spécificité d'un enzyme ne pouvant être définie que dans la mesure où son action n'est pas modifiée par des impuretés qui l'accompagnent, nous nous sommes attachée à purifier l'Apyrase, à étudier ses caractères d'homogénéité protéique et le mécanisme de son action.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

PURIFICATION DE L'APYRASE

A.- INTRODUCTION

Nous nous sommes servie de la source la plus riche d'Apyrase, des pommes de terre, pour purifier cet enzyme. L'analyse détaillée de tous les essais antérieurs de purification nous a permis d'établir un procédé personnel simple et efficace.

1.- TRAVAUX DE MEYERHOF (50) -

MEYERHOF, partant de la levure, sépare les protéines inertes à 40 % de la saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et précipite l'enzyme à la saturation totale en ce sel. Le précipité dissous dans l'eau, dialysé pendant 2 heures et centrifugé, fournit des solutions finales contenant 5-10 mg. de pro-

téine par ml.

0,1 ml d'une telle solution libère 200-300 γ de P en 5' à 30° C à pH = 6 en présence du glutathion.

Ces préparations sont fortement contaminées par les phosphomonoestérases; Elles déphosphorylent, en particulier, l'hexose diphosphate.

2.- TRAVAUX DE KALCKAR H.M. (34, 35) -

KALCKAR prépare des extraits aqueux de pomme de terre qu'il débarrasse de protéines inertes en les additionnant de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 60 % de la saturation et précipite ensuite l'Apyrase à saturation totale. Les pigments sont adsorbés sur l'hydroxyde d'Aluminium. L'enzyme est isolé par précipitation à l'alcool entre 20-33 %.

L'Apyrase ainsi obtenue, incubée en présence de CaCl_2 (0 mg,5/ml) à 30°, pH = 6,5 pendant 5', libère 9 γ P par γ de protéine.

Plus tard, dans le but de préparer des produits destinés à une détermination spectrophotométrique différentielle des composés de l'Adénine, il propose une modification à la méthode précédemment décrite. Les pommes de terre sont extraites par 3 volumes d'Acétate de NH_4 0,1 M à pH = 8,5. L'extrait est saturé en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et le précipité, redissous dans l'acétate de NH_4 0,1 M à pH = 8,5, est traité à l'hydroxyde d'aluminium pour éliminer les pigments. Les

matières inertes sont alors seulement précipitées par addition de 0,5 volume de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et la protéine enzymatique isolée du liquide surnageant par du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 0,8 de la saturation en sel. L'enzyme (pH optimum = 6,8) est activé par Ca^{++} .

3.- TRAVAUX DE KRISHNAN (39, 40) -

KRISHNAN a observé que les préparations antérieures obtenues par KALCKAR et MEYERHOF, au cours d'incubation prolongée, hydrolysent les trois groupements phosphoriques de l'ATP. Aussi y avait-il lieu de chercher à en séparer un enzyme plus spécifique.

Les pommes de terre extraites avec des solutions diluées de CNK sont précipitées à 60 % de la saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Le précipité global obtenu, remis en solution, est soumis à des fractionnements répétés au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,4 - 0,6).

KRISHNAN obtient ainsi une préparation enzymatique très active, dont le rendement est de 7 à 15 % de l'activité initiale. Elle est pratiquement incolore, possède une activité de 60.000 unités/mg de poids sec, et représente une concentration de 1000 à 2100 fois par rapport à l'activité de la pulpe de pomme de terre.

Au cours des fractionnements par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, l'activité enzymatique passe dans 2 fractions distinctes, l'une insolu-

ble, qui se sépare par dialyse du précipité contre de l'eau distillée, et une soluble, qui a servi à la purification indiquée ci-dessus. 25-40 % de l'activité est intimement liée à la fraction insoluble.

4.- CONCLUSION -

L'enzyme de KRISHNAN est considéré par l'auteur comme activable par Ca^{++} et spécifique de l'ATP. Cependant l'emploi de cet enzyme pour l'analyse des préparations d'acide Adénosine-triphosphorique a donné des résultats et ne concordant pas avec ceux obtenus par l'hydrolyse acide, ou par l'action combinée de la myosine et de la myokinase. Le pourcentage de phosphore labile libéré se montre trop élevé par suite de l'hydrolyse de l'acide adénylique (4, 69).

N.V. THOAI, ROCHE et SALTMAN (66) ont alors mis au point la préparation d'une Apyrase spécifique de l'acide Adénosine-triphosphorique, en séparant l'enzyme des autres phosphatases de la pomme de terre. La dialyse des extraits de pomme de terre contre de l'eau courante élimine la majeure partie des globulines renfermant la presque totalité des phosphomonoestérases et pyrophosphatases. Les fractionnements ultérieurs par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et par l'acétone fournissent des préparations exemptes d'activité sur les acides glycérophosphoriques adénylique et pyrophosphorique. Cependant, le rendement obtenu au cours de ce travail préli-

minaire est peu satisfaisant, les quantités de produit obtenu ont été trop faibles pour aborder une étude détaillée des caractères de spécificité de l'Apyrase et de son mécanisme d'action vis-à-vis de l'ATP.

Notre travail a consisté à mettre au point une technique de fractionnement permettant d'obtenir avec un rendement meilleur, des préparations enzymatiques suffisamment purifiées dont nous nous proposons d'étudier, par la suite, les caractères et le mode d'action.

B.- PARTIE EXPÉRIMENTALE

I - MATÉRIEL D'ÉTUDE et TECHNIQUES - MESURES D'ACTIVITÉ

Préparation du substrat -

Pour pouvoir vérifier, à chaque stade de fractionnement l'activité de l'Apyrase sur la déphosphorylation de l'ATP, il est nécessaire que nous disposions d'une quantité importante de substrat, et que, d'autre part, celui-ci soit obtenu à un très haut degré de purification.

Plusieurs méthodes ont été décrites : NEEDHAM D.M.(57), KERR S.E. (36), DOUNCE et col. (19), SZENT GYOIGYI O. (74). Plusieurs sources peuvent être utilisées : muscle de Chien,

muscle de Poisson, muscle de Cheval, muscle de Boeuf, levure de bière.

Pour des raisons de commodité, nous nous sommes servis de muscle de Boeuf fraîchement prélevé à l'abattoir et conservé durant le transport dans de la neige carbonique.

Technique utilisée pour la préparation de l'ATP de muscle de Boeuf.-

Les muscles fraîchement prélevés sont broyés au hachoir mécanique et traités par 2 volumes de solution glacée d'acide trichloracétique à 7 %. Le mélange est agité doucement pendant 1 à 2 heures à une température aussi proche que possible de 0° C., puis essoré mécaniquement. Le résidu est repris par 2 parties de solution glacée d'acide trichloracétique à 5 % et le mélange agité pendant 1/2 heure, puis essoré.

Les 2 extraits acides réunis, maintenus aussi près que possible de 0°, sont portés à pH = 8,9 avec de la soude à 10 %, puis filtrées. On ajoute aux filtrats de l'acide acétique glacial, de façon à obtenir une concentration finale de 0,2 %. On introduit de l'acétate mercurique à 20 % (5 cc pour 100 cc. de l'extrait trichloracétique). Au bout d'une heure, on recueille le précipité mercurique que l'on lave avec une solution à 1 % d'acétate mercurique contenant 0,2 % d'acide

acétique. Le précipité est mis en suspension dans de l'eau distillée (500 cc. pour 3 Kg. de muscle). On traite à froid la suspension par SH_2 avec agitation mécanique. On centrifuge et on filtre. Le précipité de sulfure mercurique est remis en suspension dans l'eau distillée traitée à nouveau par SH_2 . On filtre. Les deux filtrats sont réunis et portés à $\text{pH} = 8 - 8,5$, puis traités à SH_2 pendant 10-15'. On filtre. On amène le liquide à $\text{pH} = 5$ et on chasse SH_2 .

Le liquide clair et incolore est dilué de moitié et additionné d'une solution d'acétate de Ba 25 % (50 cc. par Kg. de muscle). On ajoute de la baryte saturée en quantité suffisante pour avoir une réaction faiblement alcaline à la phénolphtaléine. On laisse reposer 1/2 heure à basse température et l'on centrifuge. Le précipité est dissous dans la quantité minima d' HCl 0,1 N glacé et traité par l'acétate de Ba et la Baryte comme ci-dessus.

Le nouveau précipité, redissous dans HCl 0,1 N glacé est précipité encore 2 fois à l'Acétate de Ba, mais en l'absence de Baryte. La solution légèrement acide est filtrée avant la dernière précipitation.

Le dernier précipité barytique est lavé une fois à l'acétate de Ba à 1 % ($\text{pH} = 6,8$), 2 fois à l'alcool à 50°, 2 fois à l'alcool à 75°, 2 fois au mélange à parties égales d'alcool et d'éther et 3 fois à l'éther.

Le produit est ensuite desséché sous vide sulfurique

et conservé en flacons bouchés paraffinés, à basse température.

Le rendement est assez faible - 1 Kg de muscle fournit 2 - 2,5 g de sel de Ba, mais le produit fraîchement obtenu est exempt de P minéral et atteint 96-98 % de pureté.



Théorique	Trouvé
N = 8,23 %	8,12 %
P labile = 7,25 %	7,20 %
P total = 10,88 %	10,78 %

$$\text{Rapport } \frac{\text{P total}}{\text{P hydrolysable}} = 1,5 \quad \# \quad 1,5$$

Analyse du produit après 8 mois de conservation :

$$\text{N} = 8,11 \%$$

$$\text{P minéral libre} = 0,7 \%$$

$$\text{P total} = 10,08 \%$$

$$\text{P labile} = 6,52 \%$$

$$\text{Rapport } \frac{\text{P total}}{\text{P labile}} = 1,54$$

Préparation d'une solution de substrat en vue des hydrolyses enzymatiques -

On place 300 mg d'Adénosine-triphosphate de Ba, 4 H₂O dans un tube de centrifugeuse en pyrex et on le dissout à froid dans 10 ml de HCl 0,1 N. On précipite le Ba par un

excès de solution saturée de sulfate de sodium. Après quelques minutes de repos on centrifuge très rapidement. Le liquide surnageant est transvasé dans une fiole jaugée de 20 ml plongée au préalable dans un bain d'eau glacée. On ajoute à pH = 6,8 et l'on complète à 20 ml. La solution d'ATP (15 mg/ml), filtrée sur filtre sans cendre, est conservée à la glacière.

Dosage des différentes formes de P.-

Pour l'analyse de l'ATP employé, et, plus tard, pour celle de ses produits d'hydrolyse (ADP et AMP), nous avons été amenée à doser P sous ses différentes formes : P minéral, P labile, P total.

P minéral, P labile

L'ADP et l'ATP sont débarrassés du Ba, transformés en sels de sodium soluble, et neutralisés avant d'être soumis à l'action du réactif molybdique en milieu réducteur (BRIGGS-ROBISON), directement ou après hydrolyse acide (HClN) pendant 10' (au lieu de 7') dans un bain-marie bouillant.

P total

Pour la minéralisation du produit, nous utilisons la méthode de BOLIN et ITAMBERG (13).

Dans une petite fiole KJELDAHL de 100 ml, on place le produit à analyser (p $\neq$ 10 mg). On ajoute 2 ml du miné-

ralisant avec une bille de verre.

Composition du minéralisant	{	30 g de Molybdate de Na
		150 ml d'eau distillée
		150 ml SO_4H_2 concentré
		200 ml d'acide perchlorique 70-72 %

On chauffe très doucement sur un microbrûleur. L'attaque se termine après 10-15'. On laisse refroidir. Le liquide est transvasé ensuite dans une fiole jaugée et complétée à 20 ml, puis centrifugé pour éliminer le Ba. P est dosé sur 1 ml par la méthode BRIGGS ROBISON.

Dosage de N organique

Tous les dosages de N ont été effectués par micro KJELDAHL dans l'appareil de PARNAS et WAGNER.

Mesure d'activité

Des travaux précédents (40, 59, 66), ayant montré que la température optima d'incubation est de 37° et le pH optimum pour l'hydrolyse de l'ATP par l'Apyrase = 6,3, nous avons adopté le protocole suivant pour les hydrolyses enzymatiques.

Le mélange est constitué par 1 ml de solution d'histidine pH = 6,3 additionné de 0 ml,3 de solution d'ATP

(15 mg/ml) est placé à 37° pendant 5'. On ajoute 0 ml,2 d'enzyme et on porte 5' à 37°. On prélève 0 ml,5 du liquide d'hydrolyse et on dose le P par la méthode de BRIGGS-ROBISON (lectures au bout de 20' au photomètre PULFRICH avec filtre rouge S.66). Pour le témoin, on suit le même protocole, mais en remplaçant l'enzyme par de l'eau distillée. L'activité est exprimée en γ du P libéré par minute et par mg de N protéique.

II - PROTOCOLE DE PURIFICATION

Nous nous sommes servie du protocole adopté par NGUYEN VAN THOAI, ROCHE et SALTMAN (66), tout en y introduisant de nombreuses modifications dans un double but : augmenter le rendement et améliorer la purification.

Le mode opératoire adopté peut se diviser en 3 étapes :

- 1) Séparation de l'Apyrase des autres phosphatases
- 2) Concentration de l'enzyme par fractionnement au moyen de SO_4Am_2 .
- 3) Purification de l'enzyme par précipitations avec de faibles concentrations d'éthanol.

1.- Séparation de l'Apyrase des autres phosphatases -

1000 g. de pomme de terre pelées et lavées sont cou-

pées en petits morceaux et broyées au Waring Blendor avec 600 ml de solution froide de KCN 0,01 M pH = 7. Après 1 heure de macération, l'homogénéisat est passé à travers toile avec expression. L'extract, ajusté à pH = 5 avec de l'acide acétique glacial, est centrifugé. Le liquide surnageant est dialysé une nuit contre de l'eau courante. L'abondant précipité formé est séparé par centrifugation et extrait successivement en trois fois par 150 ml, 100 ml et 100 ml de solution 0,5 M KCl + 0,001 M KCN refroidie, avec agitation mécanique pendant 20' à 0° pour chaque extraction.

2.- Concentration de l'Apyrase -

Les éluats réunis, ajustés à pH = 6,5, sont fractionnés entre 40-60 % de la saturation en SO_4Am_2 . Après 1 heure de repos à 0°, le précipité est recueilli et dissous dans environ 60 ml de solution 10^{-3} M de KCN, puis dialysé avec agitation pendant 6 heures au moins contre la solution cyanurée 10^{-3} M.

3.- Purification à l'éthanol -

Après la dialyse tournante, il se forme toujours un léger précipité dont l'activité est négligeable par rapport à celle du liquide surnageant. On l'élimine par centrifugation. Le produit de dialyse est alors ramené à pH = 5,0,

puis fractionné à froid, entre 10 et 30 % d'éthanol, au moyen de l'éthanol dilué à 60 %.

Le précipité abandonné 1 nuit à -10° est recueilli, puis dissous dans 40 ml d'eau distillée et fractionné entre 15-25 % d'éthanol en volume. Un dernier fractionnement entre 15-25 % fournit le produit final, dont nous donnerons plus loin les caractéristiques.

Essais de purification

L'étude électrophorétique montre la présence, à côté de la protéine active, de 3 autres constituants, dont le taux global s'élève à environ 20 %. Les relargages par le sulfate d'ammonium, l'éthanol ou l'acétone s'étant avérés inefficaces en ce qui concerne l'élimination de ces derniers, nous avons tenté de les séparer par adsorption et par traitement thermique.

1 - Essais d'adsorption -

Nous avons utilisé le kaolin préalablement lavé à l'acide chlorhydrique concentré, puis à l'eau jusqu'à disparition des ions Cl^- . Deux séries d'expériences ont été réalisées. Pour chacune d'elle, nous employons 20 ml de solution enzymatique, dont l'activité initiale a été préalablement mesurée :

1) Dans la première expérience (I), la solution enzy-

matique est additionnée de 1 gr de kaolin en présence du tampon véronal sodique, de pH = 8,3. Le mélange est agité mécaniquement (trembleur) pendant 20', puis centrifugé. Le liquide surnageant est additionné de 1 gr de Kaolin, agité de la même manière pendant 20', puis centrifugé, Le liquide recueilli est ramené à pH = 6,3 et l'activité est mesurée par rapport au volume.

Les culots sont réunis, mis en suspension dans du tampon acéto-acétique 0,1 M (pH = 4,6), agités 30', puis centrifugés. L'activité du liquide surnageant ramené à pH = 6,3 est mesurée par rapport au volume.

2) Dans la deuxième expérience (II), 20 ml d'enzyme sont d'abord additionnés de Kaolin (1 gr) et du tampon acéto-acétique jusqu'à pH = 4,6. Après 20' d'agitation, le liquide surnageant est séparé par centrifugation, ramené à pH = 6,3 et l'activité enzymatique mesurée.

Le culot est ensuite additionné du tampon de véronal (pH = 8,3). Après 30' d'agitation le liquide surnageant est centrifugé, ramené à pH = 6,3 et l'activité est mesurée.

Les résultats reproduits dans le tableau (II) montrent qu'il existe une très grosse perte d'activité au cours de l'adsorption sur Kaolin ou lors de l'élution de l'enzyme. Le rendement n'atteint pas 50 % de l'activité initiale dans les meilleurs cas (tampon véronal pH 8,3).

Pour cette raison, nous avons renoncé à pousser plus loin nos essais.

2.- Essais thermiques

Nous avons observé que des préparations d'Apyrase dialysées conservées longtemps à + 3°C laissent parfois précipiter un produit inactif, l'activité enzymatique du liquide surnageant restant presque inchangée. Ces faits suggèrent la possibilité de dénaturer et de séparer des protéines accompagnant l'enzyme. Nous avons tenté ainsi une série de traitements thermiques de préparation d'Apyrase en la présence ou en l'absence de son substrat, l'ATP. ClNa a été également employé, ce sel ayant la propriété souvent remarquée de diminuer l'adsorption des protéines les unes sur les autres.

Des tubes à essais contenant chacun 3 ml d'enzyme sont introduits dans des bains-marie maintenus à 40°, 45°, 50°, 60° pendant 1', 2' ou 5', en présence ou non de l'ATP (0 ml,5 d'une sol. à 15 mg/ml), du ClNa (Concentration finale : 0,05 M) ou d'acide acétique 0,1 M ($\rightarrow$ pH = 5,5) jusqu'à ce qu'il se manifeste une floculation. On laisse le précipité se déposer pendant 15' à 0° C, puis on le sépare par centrifugation. L'activité enzymatique est de nouveau mesurée dans les liquides surnageants.

Quelques-uns de ces essais types ont été consignés au tableau III. Les résultats obtenus montrent que le trai-

TABLEAU II : ESSAIS D'ADSORPTION SUR KAOLIN

Hydrolyse 5' à 37° du Mélange réactionnel comprenant 1 ml de tampon histidine 0,1 M pH = 6,3 + 0 ml,3 de solution d'ATP à 15 mg/ml + 0 ml,2 de liquide enzymatique

	ESSAI I			ESSAI II		
	Enzyme initial	1ère élution. Tampon véronal pH = 8,3	2e élution. Tampon acéto-acétique pH = 4,6	Enzyme initial	1ère élution. Tampon acéto-acétique pH = 4,6	2e élution. Tampon véronal pH = 8,3
Activité par rapport au volume	6420 γ	3100 γ	0 γ	6420 γ	0 γ	3060 γ

TABLEAU III : ESSAIS THERMIQUES

Le protocole de l'hydrolyse est le même qu'au tableau précédent.

Essais	Température	Temps	ATP (2 mg/ml)	ClNa ($\rightarrow \frac{M}{20}$)	$CH_3COOH \frac{N}{10}$ ($\rightarrow$ pH=5,5)	Activité par rapport au volume
Enzyme initial (3 ml)						1142 γ
Essai I	40°	1'	+			Pas de flocculation
Essai II	40°	2'				1155 γ
Essai III	45°	2'				1200 γ
Essai IV	50°	5'		+		1190 γ
Essai V	60°	5'			+	638 γ

tement thermique opéré en la présence ou en l'absence d'ATP, de ClNa permet de faire flocculer une quantité appréciable de protéines inactives, sans altérer l'Apyrase. Ils indiquent une voie dans laquelle il est possible de s'engager pour obtenir de l'Apyrase purifiée.

III - EXPOSÉ DES RÉSULTATS

1) Rendement

1 Kg de pomme de terre fournit au moins 20 mg d'enzyme purifié. Ce rendement varie avec la qualité des pommes de terre utilisées. Par ailleurs, en travaillant sur une grande quantité (5-10 Kg) en une seule fois, nous avons pu constater des pertes considérables au cours de nos fractionnements. C'est pourquoi, en vue d'études sur l'homogénéité protéique (Electrophorèse, Courbes de relargage) qui nécessitent plusieurs centaines de mg d'enzyme, nous avons jugé préférable de travailler sur plusieurs lots de 1 kg, 500 de pomme de terre jusqu'au stade de fractionnement par SO_4Am_2 . Nous avons pu conserver ainsi pendant 2-3 semaines sans dommage, à -10° , ces précipités dans leurs eaux mères. Ces précipités ont été ensuite réunis, soumis à la dialyse tournante, puis aux fractionnements à l'éthanol.

2) Activité

Dans les conditions expérimentales choisies, l'activité enzymatique est de 3500-4000 γ P libéré par minute et par mg. de N protéique.

Au cours de très nombreuses tentatives de fractionnement, nous avons pu remarquer que l'éthanol à 95° exerce une action dénaturante vis-à-vis de l'enzyme. L'éthanol dilué à 60 % n'a pas cet inconvénient et le rendement obtenu est de 40 pour 100 de l'activité de l'extrait initial. A titre de comparaison, nous reproduisons dans les tableaux IV et V les chiffres obtenus représentant l'activité totale par rapport au volume des extraits initiaux au KCl 0,5 N et des produits de précipitation correspondante à l'éthanol à 95° ou à l'éthanol à 60° :

TABLEAU IV

Action dénaturante de l'éthanol 95° vis-à-vis de l'Apyrase

	Extraction au KCl 0,5 M + cyK 0,001 M	Produit de précipitation à l'éthanol 95°
Activité totale par rapport au volume	10.200 γ 13.050 γ	2.940 γ 3.558 γ

TABLEAU V

	Extraction au KCl 0,5 M + cyK 0,001 M	Produit de précipitation au SO_4Am_2	Produit de précipitation à l'éthanol 60°
Activité totale par rapport au volume	10.240 γ 9.900 γ	7.873 γ 6.360 γ	4.560 γ 4.500 γ

3) Courbes de solubilité

Nous avons essayé de vérifier l'homogénéité des préparations obtenues en étudiant leur relargage par l'éthanol. On place dans des tubes coniques de 12 ml,5 d'une centrifugeuse refroidie la solution enzymatique, l'eau distillée froide et l'éthanol à 60° froid, dont la concentration finale en volume varie dans la première expérience de 10 à 33 % et dans la seconde "expérience de 15 à 25 %. On bouche les tubes au moyen des capuchons de caoutchouc. On mélange et l'on place les tubes dans un bain d'alcool à -10° C. Après une nuit, on centrifuge 10' à -10° C et l'on mesure au spectrophotomètre BECKMAN ($\lambda = 2750 \text{ A}^\circ$) la densité optique des liquides clairs surnageants.

On détermine parallèlement leur activité enzymatique, la présence de l'éthanol aux concentrations employées ne gênant pas la réaction.

Les résultats de la première expérience (Tableau VI, Figure 1) (10 - 33 % d'éthanol, mettent en évidence l'existence de trois fractions, dont la principale, enzymatiquement active, se situe entre 15 - 25 % de concentration finale en éthanol. C'est la raison pour laquelle nous avons adopté cette marge de fractionnement pour nos purifications finales.

Les résultats et les courbes (Tableau VII, Figure 2) donnés entre 15-25 % ne permettent pas de déceler avec cer-

titude une hétérogénéité des préparations obtenues. La précipitation des protéines et la baisse parallèle de l'activité enzymatique se poursuivent d'une manière apparemment continue.

TABEAU VI

Relargage de solution d'Apyrase par diverses concentrations d'éthanol.

10 - 33 % d'éthanol -

Concentration finale en éthanol	Enzyme	Eau	Ethanol 60°	Densité optique (Beckman) ₀ $\lambda = 2750 \text{ Å}$	Activité γ de P- libéré par l' et par ml. de sol. enzymatique
0 %	4 ml	6 ml	0 ml	765	510 γ
10 %	4	4,35	1,65	625	390 γ
13 %	4	3,85	2,15	585	372 γ
16 %	4	3,15	2,65	525	348 γ
18 %	4	3	3	490	300 γ
20 %	4	2,65	3,35	440	222 γ
22 %	4	2,35	3,65	410	150 γ
24 %	4	2	4	400	102 γ
26 %	4	1,65	4,35	390	60 γ
28 %	4	1,35	4,65	380	18 γ
30 %	4	1	3	325	12 γ
33 %	4	0,5	5,5	327	12 γ

TABLEAU VII

Relargage de solution d'Apyrase par diverses concentrations d'éthanol.

15 - 25 % d'éthanol

Concentration finale en éthanol	Enzyme	Eau	Ethanol 60°	Densité optique (Beckman) ₀ $\lambda = 2750 \text{ Å}$	Activité γ de P libéré par minute et par ml de sol. enzymatique
0 %	4 ml	6 ml	0	810	558 γ
15 %	-	3,5	2,5	660	456 γ
16 %	-	3,35	2,65	600	390 γ
17 %	-	3,15	2,85	555	330 γ
18 %	-	3	3	510	282 γ
19 %	-	2,85	3,15	472	240 γ
20 %	-	2,65	3,35	433	186 γ
21 %	-	2,5	3,5	420	150 γ
22 %	-	2,35	3,65	400	115 γ
23 %	-	2,15	3,85	390	84 γ
24 %	-	2	4	385	66 γ
25 %	-	1,85	4,15	385	60 γ

FIGURE 1 - Courbes de relargage de la solution d'Apyrase
par l'éthanol (concentration finale 10 - 33 %)

Abscisse : p . 100 en volume éthanol

Ordonnées { 1 - à gauche : $\times$ de P libéré par minute et par
ml d'enzyme.
2 - à droite : Coefficient d'absorption lu au
spectrophotomètre BECKMAN λ
(2750 Å)

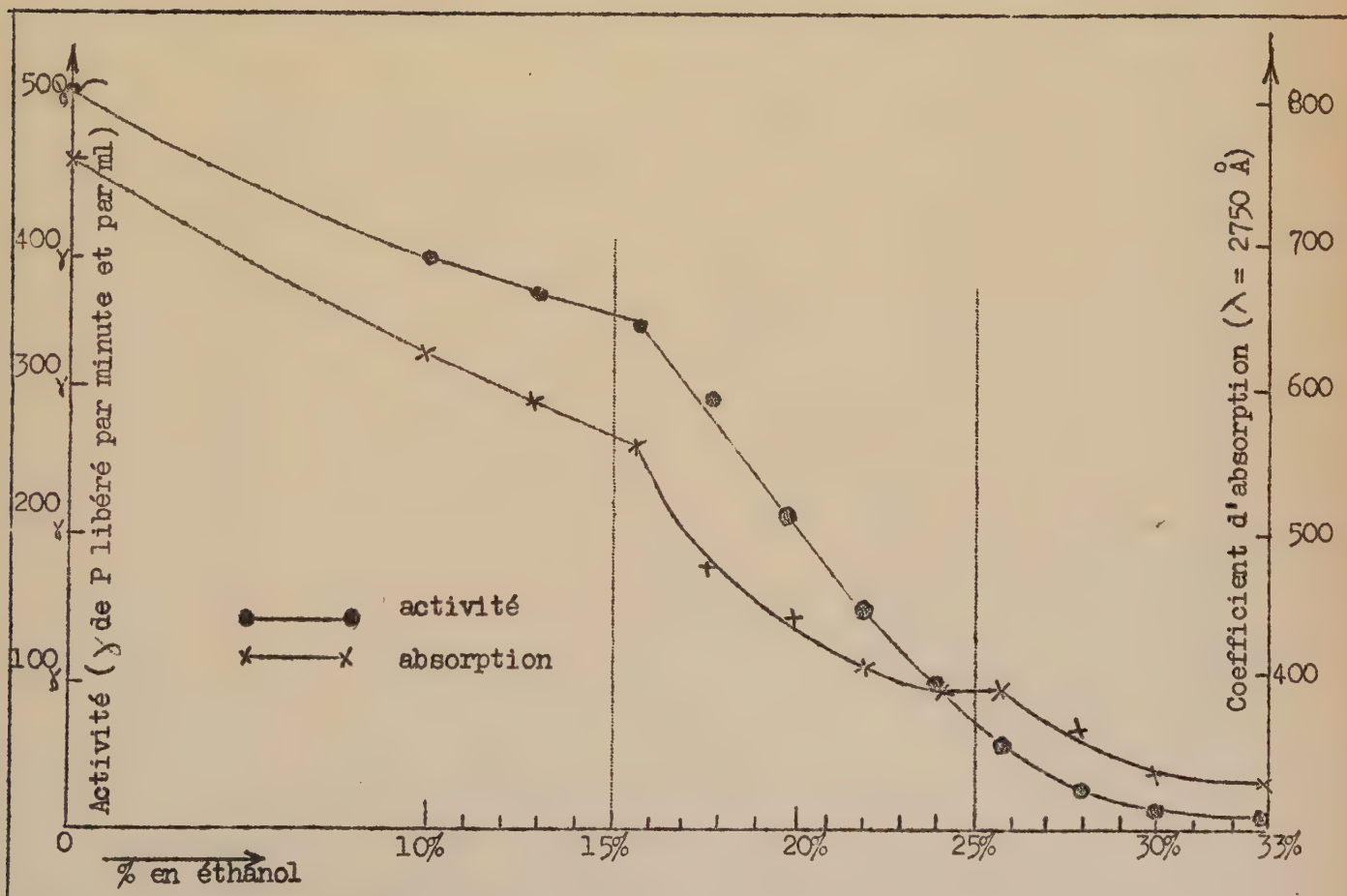
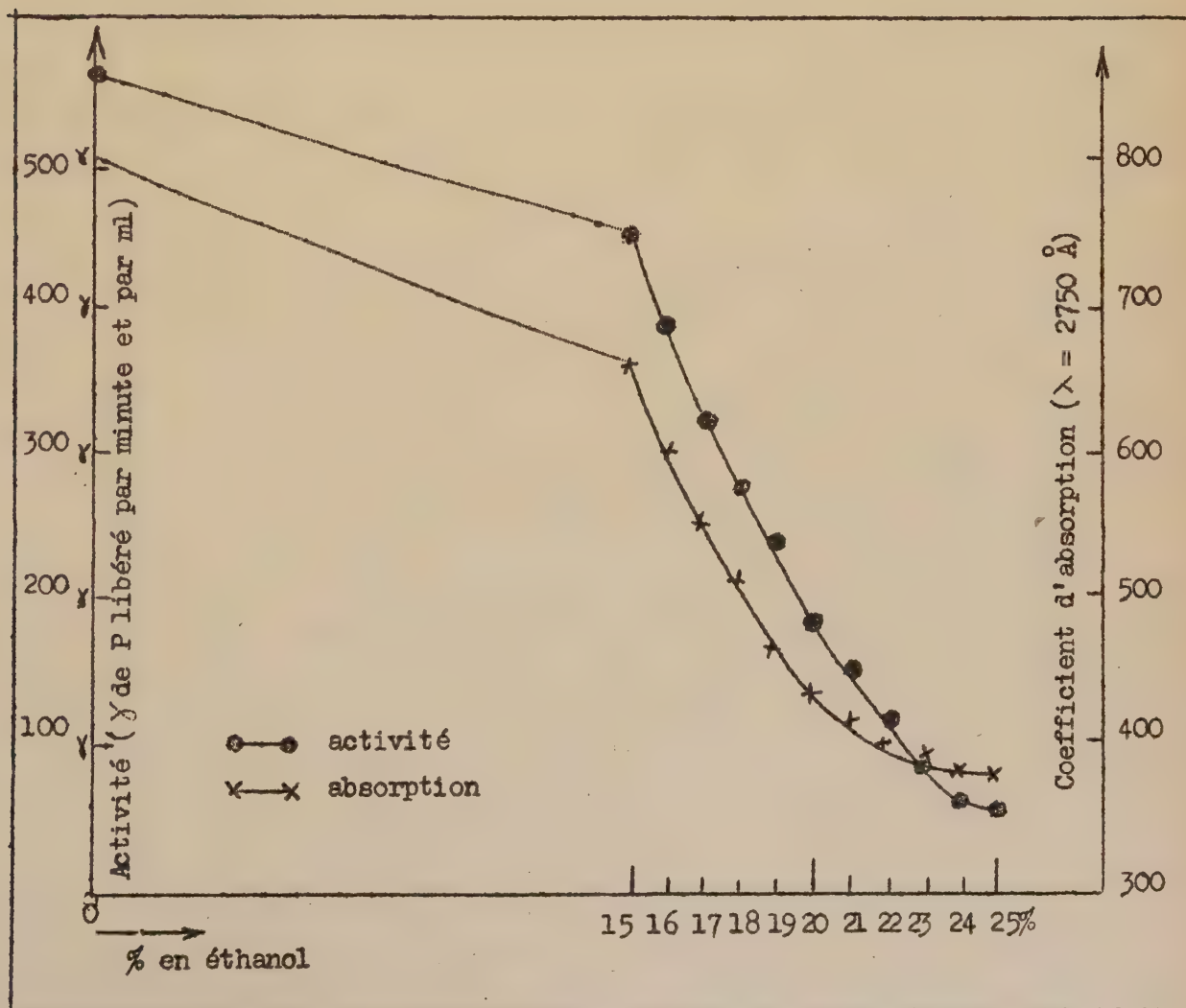


FIGURE 2 - Courbes de relargage de la solution d'Apyrase par l'éthanol (15 - 25 % de concentration finale).

Abscisse : p. 100 en volume éthanol

Ordonnées { 1 - à gauche : γ de P libéré par minute et par ml d'enzyme.
2 - à droite : Coefficient d'absorption lu au spectrophotomètre BECKMAN ($\lambda = 2750 \text{ Å}$)



4) Electrophorèse Tiselius

300 mg d'enzyme humide obtenus après deux fractionnements à l'éthanol entre 15 - 25 % de concentration finale, puis un dernier fractionnement entre 16 - 24 % sont dissous dans 15 ml. de phosphate Sörensen $\frac{M}{15}$. Le pH = 6,8 (1 ml de cette solution correspond à 1 mg,3 de N protéique).

Après 48 heures de dialyse contre le même tampon à 0° la solution est soumise à l'Electrophorèse Tiselius (Centre d'Electrophorèse, Institut physico-chimique).

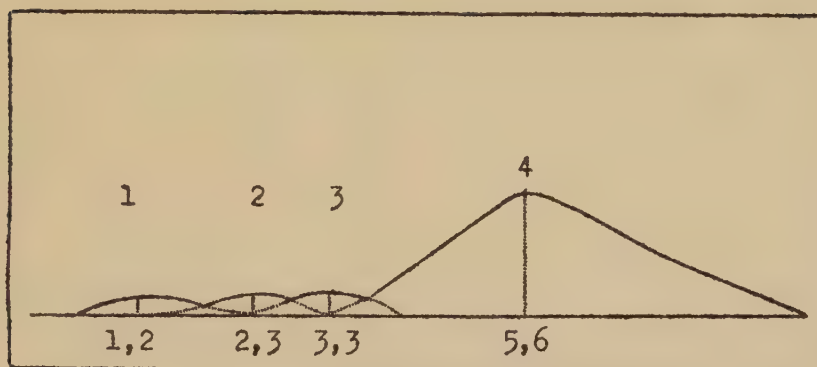
Le diagramme d'Electrophorèse (figure 3) révèle la présence de 4 fractions dont la principale enzymatiquement active représente 79,9 % de l'ensemble.

5) : Action des effecteurs ions Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}

Nous avons confirmé le point de vue de NGUYEN VAN THOAI, ROCHE, et SALTMAN (66), en ce qui concerne l'insensibilité de l'Apyrase de pomme de terre à l'action du Ca^{++} . D'autre part, l'enzyme semble être légèrement inhibé par le Mg^{++} et le Mn^{++} .

Pour nos essais, nous avons utilisé des mélanges réactionnels composés de 1 ml d'histidine : 0,1 M pH = 6,3, 0 ml,3 d'une solution d'ATP à 15 mg/ml, 0 ml,2 d'enzyme additionnés de 1 ml d'une solution de chlorure de calcium ($CaCl_2$) ou d'acétate de Magnésium $Mg(C_2H_3O_2)_2, 4 H_2O$, ou d'acétate manganoux $Mn(C_2H_3O_2)_2, 4 H_2O$, telle que la concentration

FIGURE 3 - Diagramme d'électrophorèse de l'Apyrase



Tampon Phosphate $\frac{M}{15}$ pH = 6,8

Température = + 3° C.

Inclinaison de la fente oblique = 45°

Intensité I = 20 mA.

Tension E = 250 volts

Gradient de potentiel 5,0 volt/cm

Durée de l'expérience 12.000 sec.

Nombre de fractions : 4

Mobilités exprimées en

(cm₂ - volt⁻¹. sec⁻¹ x 10⁵)

	%	Mobilités
1	9,1	1,2
2	4,9	2,3
3	6,1	3,3
4	79,9	5,6

finale en ion soit de 10^{-2} M, ou 10^{-3} M, ou 10^{-4} M. L'hydrolyse se fait toujours à 37° pendant 5' et le P est dosé suivant la méthode habituelle sur 1 ml.

Les résultats obtenus au cours de ces différents essais sont rapportés dans le tableau VIII).

TABLEAU VIII - Activité de l'Apyrase en fonction des diverses concentrations de Ca^{++} , Mg^{++} et Mn^{++} à pH 6,3. Hydrolyse 5' à 37° de 2 ml,5 de mélange réactionnel comprenant : 1 ml d'histidine 0,1 M pH 6,3
0 ml,2 d'enzyme
0 ml,3 d'ATP (15 mg/ml)
1 ml de solution d'effecteur telle que la concentration finale en ion soit 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M

Cations ajoutés mols/litre	de P libéré en 5' dans 1 ml de mélange réactionnel	Activité % de P libéré par mg de N protéique par minute.
Témoin sans effecteur	65	4062
Ca^{++} 10^{-2} M	63	3937
10^{-3} M	63	3937
10^{-4} M	65	4062
Mg^{++} 10^{-2} M	54	3375
10^{-3} M	55	3437
10^{-4} M	59	3687
Mn^{++} 10^{-2} M	52	3250
10^{-3} M	59	3687
10^{-4} M	54	3375

C.- DISCUSSION DES RÉSULTATS et CONCLUSION

Un trait essentiel se dégage tout d'abord de ce qui vient d'être exposé : c'est l'extrême simplicité de la méthode de fractionnement que nous avons adoptée pour la purification de l'Apyrase de pomme de terre.

En comparant, d'autre part, nos résultats à ceux des autres auteurs, nous constatons que si les préparations décrites par KALCKAR, MEYERHOF et même KRISHNAN enlèvent pratiquement tous les trois groupements phosphoriques de l'ATP au bout d'incubation prolongée, la nôtre utilisant la technique de dialyse contre l'eau courante de THOAI, ROCHE et SALTMAN (66) avec toutes les précautions nécessaires, est bien spécifique de l'ATP et exempte d'activité sur les acides glycéro, adényl et pyrophosphoriques. Elle confirme le point de vue de ces derniers en ce qui concerne l'insensibilité de l'enzyme aux cations divalents, non seulement au Ca^{++} , mais aussi au Mg^{++} et au Mn^{++} . De plus, les fractionnements à l'éthanol dilué, ont l'avantage d'augmenter le rendement en enzyme purifié : 1 Kg de pomme de terre fournit 20 mg de protéines finales, alors que les fractionnements à l'acétone (66) n'en procurent que quelques milligrammes.

Ils permettent, d'autre part, de préciser les caractères d'homogénéité protéique de l'enzyme et si l'existence des

20 % d'impuretés révélées par l'Electrophorèse Tiselius n'a pu encore être éliminée, ni par les essais thermiques, ni par adsorption sur Kaolin, le pourcentage élevé en enzyme pur actif (80 %) et l'homogénéité des courbes de solubilité nous mettent en mesure néanmoins de pousser plus loin notre étude et d'aborder le problème du mécanisme d'hydrolyse de l'ATP par l'Apyrase.

C H A P I T R E I I

MÉCANISME DE L'HYDROLYSE PAR L'APYRASE

A.- INTRODUCTION

- 1) KALCKAR (34) estime que la déphosphorylation de l'ATP et celle de l'ADP par les extraits de foie ou de pomme de terre sont dues à un seul et unique enzyme et que l'ADP exerce un effet inhibiteur sur la déphosphorylation du triphosphate.

L'étude comparée des vitesses d'hydrolyse du mélange d'ADP et d'ATP ou de chacun de ces substrats pris isolément l'a conduit à cette conclusion. En effet, le taux de phosphore libéré en présence de l'ATP + l'ADP est plus bas qu'avec l'ATP seul.

Lorsque les deux substrats sont ajoutés en quantité équimoléculaire, la dégradation de l'ATP semble se faire

beaucoup plus vite que celle de l'ADP. Lorsque l'ADP est ajouté en quantité deux fois plus grande que celle de l'ATP, le taux de déphosphorylation des deux substrats arrive à se rapprocher l'un de l'autre. L'effet inhibiteur de l'ADP est probablement dû à une compétition avec l'ATP servant de substrat à l'enzyme.

- 2) KRISHNAN (40) a approfondi l'étude de ce problème en poursuivant ses recherches sur la dégradation de l'Apyrase de pomme de terre en fonction du temps. Il a réalisé trois séries d'expériences avec un extrait brut de pomme de terre, une préparation purifiée d'Apyrase et une Apyrase insoluble de même origine. Sur une très large marge de dilution, dans les 3 cas, l'enzyme enlève exactement 2 des 3 groupements phosphorylés de l'ATP. Ce fait indique que la mise en liberté des 2 groupements phosphoriques labiles de l'ATP est caractéristique de l'Apyrase de pomme de terre. L'observation que l'enzyme concentré semble libérer les 3 groupements phosphoriques de l'ATP est attribuée à la contamination par la phosphatase acide (phosphomonoestérase) abondante dans la pomme de terre.

Les différentes vitesses d'hydrolyse de l'ATP et de l'ADP signalées par KALCKAR se manifestent nettement sur les courbes obtenues par KRISHNAN (Fig. 4). Avec une forte concentration en enzyme, 66 % de P total sont libérés dès

FIGURE 4 - Hydrolyse apyrasique de l'ATP
Courbe de KRISHNAN
Abscisses : temps d'incubation (en minutes)
Ordonnées : Pourcentage de P total hydrolysé

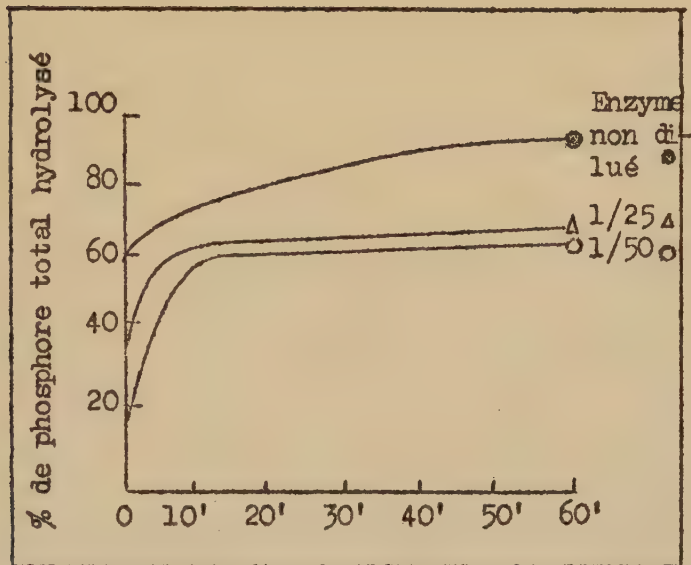
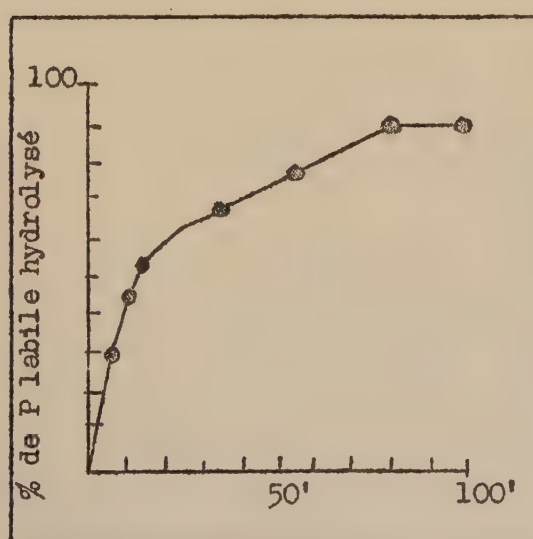


FIGURE 5 - Hydrolyse apyrasique de l'ATP
Courbe de BAILEY
Abscisses : temps d'incubation (en minutes)
Ordonnées : Pourcentage de P labile hydrolysé.



la première minute; il se produit ensuite une lente diphosphorylation telle qu'au bout de 60', 94 % de P total sont hydrolysés. Si l'enzyme est dilué au 1/25ème ou au 1/50ème, la réaction s'opère très rapidement, pendant les deux premières minutes. Mais les 2/3 de P total ne sont libérés complètement qu'après la 15e minute (ralentissement net de la réaction au cours de l'hydrolyse du 2e P labile). La courbe s'aplatit ensuite car il ne se produit plus de déphosphorylation, même si l'ATP se trouve en excès.

- 3) La courbe d'hydrolyse de l'ATP par l'Apyrase de pomme de terre en fonction du temps donné par K. BAILEY (Fig. 5) (4) illustre encore plus clairement la différence des vitesses de déphosphorylation des deux substrats. Elle comporte 2 parties, la première correspondant principalement à l'hydrolyse du groupement phosphorique terminal de l'ATP (15 minutes), et la seconde, beaucoup plus longue à celle de celui de l'ADP (75 minutes). Un changement de pente se manifeste quand la plus grande partie de l'ATP est dégradée en ADP, et un autre, quand l'hydrolyse du P labile est complète.

Une courbe à peu près semblable a été obtenue par ALBAUM et KLETZKIN (1) avec l'ATP du "Drosophila melanogaster". L'hydrolyse totale est plus élevée (7 %) que celle obtenue en présence de la myosine + myokinase, mais 2-3 % des 5 % de pyrophosphate minéral présent sont libérés par

l'action de la pyrophosphatase présente dans l'enzyme de pomme de terre.

- 4) KWAN HUA LEE et J.J. EILER (44) rapportent l'action d'une préparation de pomme de terre, qui dans des conditions de dilution convenable, présente une activité négligeable vis-à-vis de l'Adénosine-5-phosphate et du Pyrophosphate minéral. Cet enzyme hydrolyse les deux groupements phosphoriques labiles de l'ATP à une température supérieure à + 7° C, tandis qu'à une température égale ou inférieure, il ne catalyse que le groupement terminal.

Les courbes d'hydrolyse obtenues à 37°, 27°2, 17° démontrent aussi que le phosphore minéral est libéré en deux étapes, la première plus rapide que la deuxième; ce fait indique que la préparation est très notablement plus active vis-à-vis du groupement terminal de l'ATP (P_3) que de celui de l'ADP (P_2) (figure 6).

A 6°8 et à 1°9, l'hydrolyse s'arrête brusquement quand 50 % du P labile ont été libérés; cette observation suggère que le phosphore libéré représente l'hydrolyse exclusive et complète du groupement phosphorique terminal.

Dans les mêmes conditions, les préparations enzymatiques ne présentent qu'une activité négligeable vis-à-vis de l'ADP, sur une période de plus de 90 minutes. Les calculs basés sur l'équation d'ARRHENIUS et utilisant les Constantes d'hydrolyse du deuxième Phosphore à 37°, 27°2 et 17°, quel

que soit le substrat employé, ATP ou ADP, suggèrent que l'énergie d'activation augmente avec l'abaissement de la température.

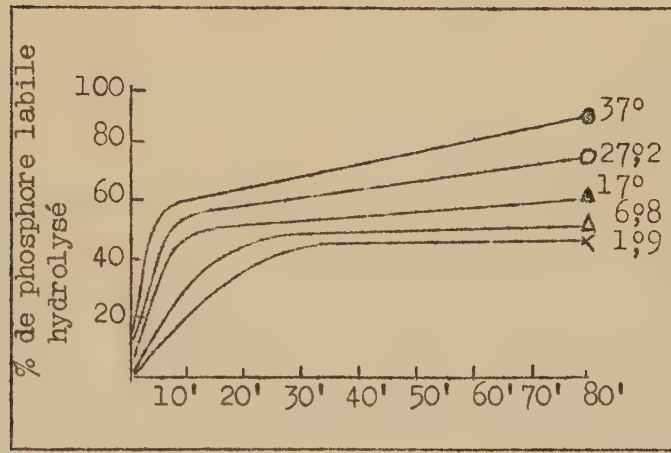
Il est très possible que, à cause de l'inhibition réversible (KISTRAKOWSKY - LUNRY (36), 1949) de l'enzyme et d'autres facteurs, des valeurs très élevées sont atteintes pour l'énergie d'activation à la température voisine de 7°. Les auteurs reconnaissent cependant qu'il faudrait entreprendre des recherches plus approfondies pour arriver à une meilleure compréhension de la cinétique de l'hydrolyse apyrasique et de ses caractéristiques de température.

La grande différence entre les valeurs des constantes d'hydrolyse du 3e et du 2e radical phosphorique (30 fois) pour KISTRAKOWSKY et LUMRY, en comparaison de celle rapportée par KALCKAR et KRISHMAN (2 fois) pose la question de savoir si les préparations dénommées Apyrase constituent un enzyme polyvalent, d'affinité très différente pour l'ATP et l'ADP ou un mélange en proportions diverses d'ATPase et d'ADPase.

FIGURE 6

Courbes d'hydrolyse de l'ATP par l'enzyme de LEE et EILER
à différentes températures.

{ Abscisses : temps d'incubation en minute
{ Ordonnées : % de P labile hydrolysé



B.- PARTIE EXPERIMENTALE

I - ÉTUDE CINÉTIQUE

a) Protocole d'expérience -

Pour étudier la double spécificité des préparations d'Apyrase sur ses deux substrats, l'acide Adénosine triphosphorique et l'acide Adénosine-diphosphorique, nous avons mesuré les vitesses de l'hydrolyse séparée ou simultanée des 2 substrats. Nous avons réalisé deux séries d'essais :

- l'une avec de fortes concentrations en enzyme actif et de concentrations moyennes en substrats,
- l'autre en présence de teneurs élevées en substrats et d'enzyme dilué.

Dans le premier cas, l'enzyme n'est pas saturé en substrat, dans le second des phénomènes de compétition sont susceptibles de se manifester. Le protocole d'hydrolyse est le même que celui décrit précédemment. On place dans des tubes de la première série d'expériences 0 ml,2 d'enzyme (1 ml correspond à 54 γ de N protéique), plus des quantités voulues de solutions 0,2 M d'ADP ou d'ATP séparées ou mélangées, plus une quantité d'histidine 0,1 M pH = 6,3 suffisante pour compléter le volume total à 1 ml,5. Les tubes témoins, sans enzyme, sont placés en même temps que les mélanges actifs au thermostat à 37° C.

Dans la deuxième série d'essais, on emploie les mêmes solutions 0,2 M d'ADP et d'ATP, mais en augmentant les quantités à ajouter dans le mélange réactionnel. On ajoute 0 ml,2 de solution enzymatique précédente diluée au 1/4, plus de l'histidine 0,1 M pH = 6,3 q.s. pour 1 ml,5. L'hydrolyse se fait toujours à 37° pendant 5' et le P libéré est dosé par la méthode habituelle.

b) Exposé des résultats obtenus -

Les résultats obtenus, rapportés dans les tableaux IX, montrent que, dans le premier cas les vitesses d'hydrolyse sont pratiquement additives, aux erreurs de mesure près. Chacun des substrats, ATP ou ADP, est hydrolysé pour son propre compte, la présence de l'ADP à concentration plus forte ou égale à celle de l'ATP ne gêne pas la déphosphorylation de ce dernier.

En réalité, les faits observés tiennent à l'emploi de préparations très actives et de quantités insuffisantes de substrats. En inversant les concentrations de substrat et d'enzyme, on observe que les vitesses d'hydrolyse ne sont plus additives. Les deux substrats ne sont donc pas hydrolysés simultanément.

2 - ANALYSE DES PRODUITS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE -

a) Protocole d'expérience - Analyse chromatographique

Les résultats obtenus, en accord avec ceux de KALCKAR

TABLEAU IX : HYDROLYSE SIMULTANEE ou SEPARÉE DES ACIDES ADENOSINE DI (ADP) et TRIPHOSPHORIQUE (ATP)

ESSAI I - Solution 0,2 M ADP ou ATP + 0 ml,2 enzyme + solution 0,1 M histidine pH 6,3, q.s. 1 ml,5.
Témoin, mélange sans enzyme 5' à 37°.

ESSAI II - Solution 0,2 M ADP ou ATP + 0,2 ml de la solution enzymatique précédente diluée au 1/4 + solution 0,1 M histidine pH 6,3, q.s. 1 ml,5.
Témoin : même mélange sans enzyme 5' à 37°.

Les chiffres expriment en γ de P dosés dans la prise d'essai

ESSAI I				ESSAI II			
0 ml,3 ADP	0 ml,15 ATP	0 ml,3 ATP	0 ml,3 ADP + 0 ml,15 ATP	0 ml,3 ADP	0 ml,5 ADP	0 ml,25 ATP	0 ml,5 ADP 0 ml,25 ATP
58	32	65	91	105	34	30	28 25 26

et de KRISHNAN, montrent qu'il y a compétition entre l'ATP et l'ADP. L'interprétation donnée par le premier conforme au principe généralement admis en enzymologie que le produit de la réaction (ADP), inhibe l'hydrolyse de l'ATP, reste cependant incertain à cause de la difficulté de distinguer les deux restes phosphoriques labiles non marqués.

Afin de connaître exactement le mécanisme de déphosphorylation de l'ATP et de l'ADP, nous nous sommes adressée à la chromatographie sur papier pour analyser les produits d'hydrolyse de l'ATP par l'Apyrase purifiée de pomme de terre.

1 - Préparation et développement des chromatogrammes

Les papiers Whatman n° 1 sont lavés à l'acide acétique 2 N, puis débarrassés de toute trace d'acide acétique par rinçage plusieurs fois avec de l'eau distillée. Une fois séchés, les papiers sont coupés en bandes de 35 cm/9 cm en vue de la chromatographie ascendante.

Les spots (3 μ l environ pour les témoins, davantage pour les essais) sont déposés à 2 cm,5 d'intervalle l'un de l'autre, le long de la ligne de départ, située à 4 cm. du bord.

Nous employons comme corps de référence l'ATP, l'ADP, l'AMP en solution 0,02 M et le phosphate d'ammonium en solution 0,01 M. Un excès de sodium nuit à la

migration (traînées). Il faut donc avoir soin d'ajouter une quantité juste suffisante de SO_4Na_2 saturée pour précipiter le baryum des échantillons des sels d'ATP ou d'ADP.

Les bandes de papier sont suspendues verticalement dans les bocaux (380 mm de haut et 110 mm de diamètre) renfermant 200 ml de solvant et placés dans des chambres thermostatiques maintenues à $20^\circ \pm 0^\circ,1 \text{ C.}$

Nous avons choisi pour nos essais un solvant basique préconisé par HANES et ISHERWOOD (29) Pyridine - Ammoniaque Eau (6 : 2; 1) et un autre - légèrement modifié d'après nos expériences personnelles et qui semble permettre une migration et une répartition des taches meilleure que le premier : Pyridine-Ethanol-Ammoniaque-Eau (3 : 3 : 3 : 1).

Le développement dure 15 heures. Les papiers sont ensuite sortis et séchés sous un courant d'air.

2 - Révélation des chromatogrammes

Comme révélateur nous utilisons le Réactif de HANES et ISHERWOOD

{	5 cc d'acide perchlorique 60 %
	10 cc HCl N
	25 cc Molybdate de NH_4 4 %
	Eau distillée q.s.pr. 100 cc.

On pulvérise le réactif sur les bandes de papier à raison de 1 ml pour 100 cm_2 . On sèche à l'air libre, puis on porte le chromatogramme 8' à 85° pour l'hydrolyse des esters phosphoriques. Le phosphate minéral apparaît en

jaune dès la pulvérisation, tandis que les spots apparaissent en bleu après exposition dans un récipient saturé de vapeurs d' H_2S .

3 - Analyse chromatographique du mélange réactionnel aux diverses étapes de la réaction.

9 ml de solution d'ATP de pH 6,3 (15 mg/ml) placés dans une petite fiole d'ERLENMEYER sont portés 5' à 37°. Ils sont ensuite additionnés de 1 ml d'enzyme (= 54 % de N protéique) et agité. Un ml de liquide est immédiatement prélevé, additionné d'une goutte d'ammoniaque diluée, de façon à porter le pH du milieu à pH 7,2, puis plongé rapidement dans un bain-marie bouillant.

Sur ce liquide d'hydrolyse immédiatement remis à 37°, des prélèvements semblables à celui qui vient d'être décrit sont réalisés à 1', 2', 3', 4', 5', 10', 15'.

On ajoute aux différentes prises d'essai la quantité théorique de mixture magnésienne (0,3 - 0,6 ml de la mixture magnésienne^(*) diluée au 1/10) pour précipiter le phosphate minéral libéré et l'on laisse une nuit à la chambre froide. Après élimination du précipité, le filtrat est prêt pour l'analyse chromatographique. La chromatographie ascendante est réalisée à 20° sur du papier Whatman n° 1, selon la technique indiquée ci-dessus.

(*) 120 gr Cl_2Mg cristallisé 6 H_2O , 160 gr ClNH_4 .

Dissoudre dans 1/2 l. d'eau. Ajouter 260 cc. NH_4OH 22° Bé. Compléter à 1 lit. avec de l'eau distillée.

b) Exposé des résultats

1 - Les schémas suivants (fig. 7) montrent les différents R_F correspondants aux divers corps : Phosphate minéral, ATP, ADP, et AMP de muscle.

Avec le solvant I (Py-Am-Eau), l'ATP et l'ion phosphorique ne migrent pas, l'ATP et l'AMP ont pour R_F respectifs : 0,01 et 0,06 (tableau X).

L'avantage du solvant II (Py-Ethanol-Am-Eau) est la possibilité de séparer le phosphate minéral de l'ATP et d'autre part, la révélation à côté de la tache de l'ATP de deux autres petites taches dont l'une correspond bien à l'emplacement de celle du Phosphate minéral et la seconde à une impureté non identifiée encore, se trouvant dans l'ATP et correspondant probablement à un isomère de ce dernier.

TABEAU X

Valeurs numériques moyennes des R_F .

Esters phosphoriques	Solvant I	Solvant II
ATP	0,01	0,21
ADP	0,06	0,25
AMP muscle	0,15	0,34
AMP levure		0,42
Phosphate minéral	0,00	0,16

I : Pyridine, ammoniacque, eau (6 : 2 : 1)

II : Pyridine, éthanol, ammoniacque, eau (3 : 3 : 3 : 1)

FIGURE 7 : Migration des témoins : Phosphate minéral (P^{te}) :
 ATP, ADP, AMP en chromatographie ascendante sur
 papier Whatman n° 1 - Température : 20° C.
 Solvant I : Pyridine, ammoniacque, Eau (6 : 2 : 1)
 Solvant II : Pyridine, éthanol, ammoniacque, eau
 (3 : 3 : 3 : 1)

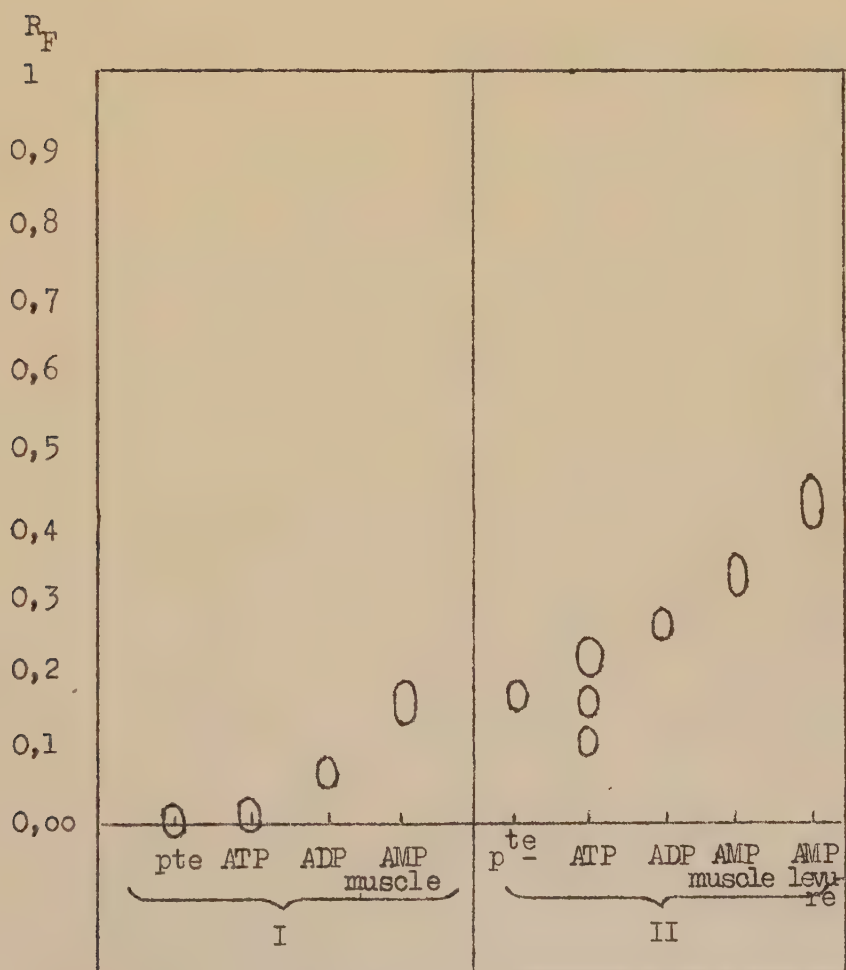
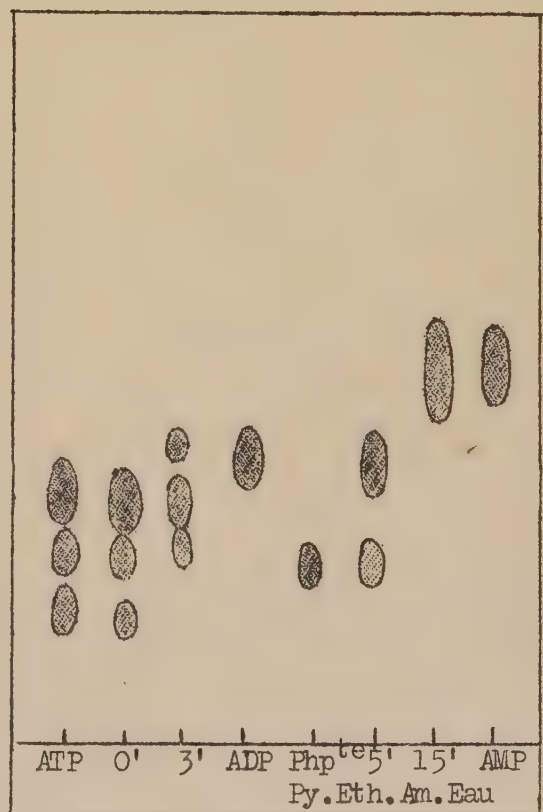
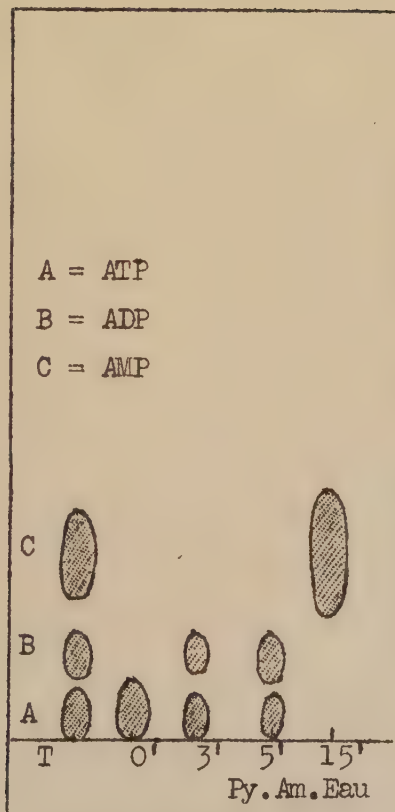


FIGURE 8 : Chromatogrammes des produits de l'hydrolyse
apyrasique aux différents temps de la réaction
chromatographie ascendante à 20°. Papier What-
man n° 1.

- a) En mélange pyridine-ammoniaque-eau (6 : 2 : 1)
b) En mélange pyridine - éthanol - ammoniaque - eau
(3 : 3 : 3 : 1).



2 - Révélation des produits d'hydrolyse aux diverses étapes de la réaction.

Les figures (8) montrent que l'hydrolyse de l'ATP porte d'abord spécifiquement sur un reste phosphorique. Après 5' d'hydrolyse, la présence de ce dernier n'est plus décelable par chromatographie, mais il n'apparaît encore aucune trace d'acide adénylique. La formation de celui-ci ne devient visible qu'à partir de la 10e minute et l'hydrolyse de l'ADP semble être complète à la 15ème minute.

C.- DISCUSSION DES RÉSULTATS

L'hydrolyse simultanée ou séparée de l'ATP et de l'ADP montre que, lorsque l'enzyme n'est pas saturé en substrat (essai I), les deux dérivés phosphoriques de l'Adénosine sont hydrolysés à une vitesse semblable. Avec un enzyme dilué et une forte concentration en substrats, nous observons les faits déjà signalés par KALCKAR, KRISHNAN et BAILEY : il y a compétition entre l'ATP et l'ADP.

Mais, contrairement aux interprétations des auteurs précités et au principe généralement admis, que le produit de la réaction (ADP) inhibe l'hydrolyse du substrat initial (ATP), l'analyse chromatographique sur papier montre que c'est ce dernier qui gêne la dégradation du premier. Il est

probable que des traces d'ATP non décelables à la chromatographie sont suffisantes pour empêcher la formation d'AMP.

L'apparition de la tache correspondante à l'acide adénylique accuse un certain retard (10^e minute) sur la dégradation complète d'ATP (5^e minute). Il existe un décalage marqué entre les deux hydrolyses. Ce fait tend à montrer que l'Apyrase est un enzyme polyvalent, dont l'affinité pour l'ATP est de loin supérieure à celle qu'il présente pour l'ADP. Il est en accord avec la différence d'énergie d'activation (30 fois plus grande) observée par LEE et EILER entre l'hydrolyse de l'ATP et l'ADP. Il explique que le maintien de la température de réaction à 7° suffit pour annihiler l'hydrolyse de l'ADP en présence d'ATP.

Ce fait peut et doit être confirmé par la possibilité d'utiliser l'Apyrase à la préparation des deux produits d'hydrolyse de l'ATP : l'ADP et l'AMP. L'isolement de ces deux corps à partir du milieu de la réaction démontrera le décalage des deux types d'hydrolyse; ce dernier serait d'autant plus objectivement confirmé que le rendement en ADP isolé serait plus important.

C H A P I T R E I I I

APPLICATIONS

UTILISATION DE L'APYRASE DANS LA PREPARATION DES ACIDES ADENOSINE DI- et 5- MONOPHOSPHORIQUE

A.- INTRODUCTION

Le décalage marqué entre l'hydrolyse de l'ADP et celle de l'ATP, l'inhibition de celle-ci par des traces du premier substrat, doivent permettre la préparation, non seulement du produit final de l'hydrolyse apyrasique : l'acide adénosine 5-monophosphorique, mais également celle du corps intermédiaire, l'ADP.

Il a paru en outre utile de mettre au point une technique de préparation des acides adénosine 5-mono et diphosphorique. Afin de faciliter la comparaison des résultats que nous avons obtenus, avec ceux fournis par les principales méthodes de préparation utilisées jusqu'à présent, nous allons en exposer brièvement les modalités.

1 - Préparation de l'ADP

a) Méthode chimique :

Hydrolyse alcaline de l'ATP sous forme de sel de Mg (11).

Le sel de Ba de l'ATP est dissous dans HCl 0,2 N. Le Ba est précipité par une quantité calculée de solution de SO_4Mg 10 %. De la soude N est ajoutée à la solution pour amener le pH à 4,5. Cette solution est chauffée pendant 1 heure au bain-marie bouillant, puis refroidie et filtrée. Le filtrat refroidi à 0° est acidifié avec NO_3H 0,2 N et le Réactif de LOHMANN (100 g $(\text{NO}_3)_2\text{Hg}$, 8 H_2O , 25 ml H_2O , 25 ml NO_3H concentré) est ajouté en léger excès. Le précipité résultant après lavage est resuspendu dans l'eau, décomposé par H_2S . Le filtrat séparé de HgS est aéré pour chasser l'excès de H_2S . Une solution saturée d'acétate de Ba dans 50 % (V/V) d'éthanol est ajoutée, puis finalement de l'éthanol absolu pour amener la concentration finale à 50 %.

Le précipité barytique est lavé avec l'éthanol à 50 %, l'éthanol pur et l'éther, puis séché sous vide.

Rendement 80 %.

b) Méthodes enzymatiques -

1 - Méthode de COLOWICK et KALCKAR (17) avec l'hexokinase.

L'ADP est préparé à partir de l'ATP en ajoutant celui-ci à l'hexokinase de levure en présence du glucose. Après incubation de 30' à 30° C, le mélange est traité par l'acide trichloracétique, puis filtré. Le filtrat déprotéinisé est porté à pH = 8 et traité par l'acétate de baryum qui précipite l'ADP en laissant l'hexose-6-phosphate en solution.

Après centrifugation et lavage, le précipité est dissous dans NO_3H et le nucléotide précipité avec du nitrate mercurique. Le sel de Hg est décomposé par H_2S et après aération, la solution est neutralisée et le nucléotide est reprécipité avec de l'acétate de baryum.

0 g,7 d'ATP-Ba fournissent 0 g,4 d'ADP sous forme de sel de Baryum anhydre.

2. - Méthode de G.A. LE PAGE (62)

L'ADP peut encore être préparé par hydrolyse enzymatique de l'ATP par des préparations ATPasiques de muscle d'Ecrevisse (47) et de Lapin (3).

Le protocole préconisé par LE PAGE est le suivant :

A 100 ml d'une solution d'ATP 1 % sont ajoutés 25-35 gr de fibres musculaires provenant de la queue d'Ecrevisse. Le mélange est agité lentement 20' à 20°. Après filtration, la solution est ajustée à pH = 6,8 avec HCl. Un excès d'acétate de baryum est ajouté et le mélange refroidi. Le précipité est centrifugé et redissous dans un

minimum de NO_3H 0,2 N froid. La solution froide est traitée par le Réactif de LOHMANN.

Le précipité centrifugé, mis en suspension dans l'eau est décomposé par H_2S , HgS est centrifugé, lavé avec NO_3H 0,2 N. La solution et le liquide de lavage sont réunis, débarrassés d' H_2S , centrifugés puis ajustés à pH 6,8.

Un volume d'éthanol 95° et un excès d'acétate de baryum sont ajoutés. Le précipité d'Adénosine-diphosphate de baryum est lavé avec de l'éthanol, puis de l'éther et ensuite séché sous vide sulfurique.

Si l'Adénosine triphosphatase de muscle de lapin est employée, l'hydrolyse doit se faire à 37° en 20' à 40'. La solution est ensuite déprotéinisée par addition d'acide trichloracétique à une concentration finale de 10 %.

Le précipité est centrifugé et la solution est traitée comme ci-dessus.

II - Préparation de l'acide adénylique de muscle

a) Méthodes chimiques

1) A partir des tissus frais

a) Techniques d'OSTERN. - A partir de la viande de Cheval (60).

10 Kg. de viande fraîche réduite en purée sont introduits par portions dans 10 l. d'eau bouillante. L'ébullition dure 3-5 minutes pendant laquelle sont ajoutés 15-20 cc.

d'acide acétique concentré. Après neutralisation par de la soude, puis légère acidification avec de l'acide acétique et filtration, un léger excès de solution saturée de baryte est ajoutée pour précipiter les phosphates.

Dans le liquide surnageant neutralisé avec de l'acide acétique, les nucléotides sont précipités avec une quantité juste nécessaire d'acétate de Pb saturée.

Après filtration, le filtrat qui contient une petite partie de nucléotide est additionné d'ammoniaque en léger excès. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner, lavé à l'eau et sera traité comme le précipité plombique de la manière suivante :

Les précipités sont lavés 2 fois avec de l'eau, filtrés sur Büchner, recouverts d'une couche finement pulvérisée de CO_3Ba , mis en suspension dans l'eau, puis traités par H_2S . Le précipité est réchauffé dans 2 l. d'eau, lavé avec de l'eau saturée de H_2S , et le filtrat est traité de nouveau par un excès de CO_3Ba , chauffé vers $50^\circ\text{-}60^\circ$, filtré sur filtre épais et évaporé sous vide, jusqu'à 200 cc. Après filtration sur Büchner et repos 48 h. dans la glacière, il se forme un précipité de sel de baryum de l'acide inosique. que l'on élimine par filtration. L'acide adénylique dans le filtrat est précipité par 5 fois son volume d'alcool à 96° , transformé en sel de mercure, débarrassé du sulfure de mercure et filtré. Le baryum est enlevé par une quantité correspondante de SO_4H_2 et l'excès

d'ion SO_4^{--} éliminé par l'acétate de baryum.

Le produit est ensuite précipité par l'acétate neutre de plomb décomposé par H_2S , filtré et le filtrat évaporé sous vide (à $40^\circ\text{-}50^\circ\text{ C}$) est de nouveau additionné d'alcool à 96° jusqu'à trouble abondant. Les cristaux d'acide adénylique sont dissous dans un minimum d'eau chaude et recristallisés par addition d'alcool; 10 Kg. de viande de Cheval fournissent 3 g,5 d'AMP.

b) Technique de BUELL - A partir du coeur de Boeuf (14).

Les muscles coupés en petits morceaux sont rapidement congelés pour inhiber l'action enzymatique. Les protéines sont éliminées de l'extrait aqueux par l'action combinée de la chaleur et de l'acide picrique. L'acide adénylique est recueilli à l'état de sel de Hg, puis séparé sous forme de "précipité jaune", complexe de picrate d'Al, réaction-clé pour l'isolement des nucléotides de l'Adénine, à partir de leurs sources naturelles.

Finalement ce "précipité jaune" est transformé en sel de plomb, dont l'acide adénylique est libéré sous forme cristallisée par des traitements à l'acétone. 11 livres de muscle de coeur fournissent 0 g,800 d'AMP.

c) Technique de RAROPOORT et NELSON. - A partir du foie de Lapin ou de Chien (67).

Les organes sont rapidement prélevés et mis dans un mélange congelant et extraits à l'acide trichloracétique.

Les nucléotides, le glutathion et un composé azote non phosphorylé sont précipités par l'acétate mercurique. Après élimination du mercure, les sels de baryum sont précipités et la solution contient de l'acide adénylique avec du glutathion. L'acide adénylique est séparé du glutathion par une précipitation préliminaire à l'acide phosphotungstique, isolé sous forme de phosphotungstate de baryum, transformé en sel de plomb à partir duquel il est cristallisé avec de l'acétone.

100 g. de foie fournissent 10 mg d'AMP.

2) A partir de l'ATP

Technique de KERR (36)

Le sel de baryum de l'ATP dissous dans l'acide chlorhydrique dilué est reprécipité par neutralisation à la baryte. La suspension est immergée dans un bain-marie bouillant avec additions à la burette de la quantité calculée de baryte nécessaire pour l'hydrolyse (2 ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2\text{N}$ par mM. d'ATP). Après 30' d'hydrolyse, puis refroidissement, le précipité est dissous dans l'acide chlorhydrique dilué, puis reprécipité par la baryte jusqu'à légère coloration rose à la phénolphtaléine.

Le liquide surnageant contenant l'adénylate de baryum est traité par l'acétate mercurique. Après élimination du mercure, l'acide adénylique est obtenu à l'état cristallisé, par addition de 3 volumes d'acétone. Rendement 72 %.

III - Conclusions -

En définitive l'ADP peut être obtenu par hydrolyse chimique de l'ATP ou par action de l'hexokinase de levure ou de l'ATPase de muscle sur le même corps. Nous n'avons pas expérimenté la méthode de COLOWICK et KALCKAR. Par contre, nous avons entrepris à plusieurs reprises la préparation de l'ADP par hydrolyse acide ou par action de l'ATPase. Dans le premier cas, l'hydrolyse reste incomplète à cause d'une acidité insuffisante ($\text{pH} = 4,5$), ou devient trop forte (abaissement du pH ou prolongation du temps d'hydrolyse). Aussi le résultat traduit-il un abaissement considérable du rendement (30-40 %). L'emploi de l'ATPase de muscle est rendu incommode en raison de la présence de désaminase, dont l'élimination indispensable et laborieuse, entraîne de grosses pertes d'activité. En outre, l'hydrolyse prolongée à 37° nécessaire à une dégradation quantitative de l'ATP entraîne une inactivation graduelle de l'enzyme et la baisse du rendement final en ADP. Dans le meilleur des cas, ce dernier ne dépasse pas 40 % de la théorie.

L'isolement de l'AMP à partir des tissus frais (foie ou muscle) conduit à des rendements très faibles, ce que nous avons pu confirmer personnellement. En outre, il est très difficile d'éliminer complètement l'acide inosique.

L'hydrolyse barytique de l'ATP n'est que partielle lorsqu'elle se limite à 30', comme l'indique KERR; le ren-

dement effectif que nous avons obtenu n'a pas dépassé 30 %. La prolongation de l'hydrolyse ou l'emploi d'une plus forte alcalinité entraîne par contre la dégradation de l'AMP lui-même.

Nous nous sommes donc proposée d'utiliser l'Apyrase pour préparer l'ADP et l'AMP, en nous efforçant d'assurer un rendement élevé en produit pur.

B.- PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Préparation de l'adénosine diphosphate de baryum -

a) Protocole expérimental

1 g,5 d'Adénosine-triphosphate de baryum est dissous dans 60 ml d'acide chlorhydrique 0,2 N glacé et le baryum précipité par 3 ml de solution saturée de SO_4Na_2 . Après ajustement à $\text{pH} = 6,3$ avec de la soude diluée, on centrifuge. On élimine le précipité. On complète le liquide surnageant à 100 ml et on le porte de 5 à 10' à 37° .

On ajoute 20 ml de solution d'Apyrase (7 mg de protéine enzymatique). Après 7 minutes d'hydrolyse à 37° , on ajoute 60 ml d'une solution à 10 % d'acide trichloracétique, on filtre à la chambre froide.

Le filtrat est précipité par 50 ml de solution à 20 %

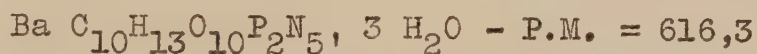
d'acétate mercurique dans l'acide acétique à 2 °/oo. Après une heure de repos à -5°, le précipité est recueilli par centrifugation, lavé avec une solution à 1 % d'acétate mercurique, remis en suspension dans 60 ml d'eau distillée et traité à froid par un courant de H₂S.

Après centrifugation et lavages du précipité de sulfure mercurique, les liquides sont réunis, débarrassés de SH₂ et précipités par 30 ml de solution à 25 % d'acétate de baryum et 130 ml d'éthanol à 95°.

Après une nuit à 0°, le précipité recueilli par centrifugation est lavé une fois à l'alcool à 50°, une fois à l'alcool à 70°, une fois à l'alcool plus l'éther (parties égales), deux fois à l'éther, puis séché sur P₂O₅.

b) Pureté et rendement

L'analyse chimique du produit donne des chiffres correspondant au sel de baryum à 3 H₂O.



	<u>Théorique</u>	<u>Trouvé</u>
P total	10,06 %	9,85 %
P labile	5,03 %	5,02 %
N	11,36 %	11,09 %

1 gr,5 d'ATP (sel de baryum à 4 H₂O) fournit 0 g,689 d'ADP (sel de baryum à 3 H₂O), ce qui correspond à 70 % de la théorie.

2 - Préparation de l'acide Adénosine 5-monophosphorique

a) Protocole de préparation

1 g d'Adénosine-triphosphate de baryum est dissous dans 60 ml de HCl 0,2 N glacé. On ajoute 2 ml de solution saturée de SO_4Na_2 et on centrifuge. Le liquide est ajusté à pH = 6,3 avec de la soude diluée et complétée à 100 ml. avec de l'eau distillée.

La solution d'Adénosine triphosphate portée à 37° pendant 5' est additionnée de 20 ml de solution d'Apyrase (correspondant à 7 mg de protéine enzymatique) et abandonnée 30', à cette température.

La réaction est alors arrêtée par addition de 20 ml. d'une solution à 25 % d'acétate de Ba et de la solution saturée de Baryte jusqu'à coloration légèrement rose à la phénolphtaléine. Le mélange est porté 5' au bain-marie bouillant, puis centrifugé, le précipité lavé avec 15 ml de solution à 1 % d'acétate de Ba. Le liquide de lavage et la solution d'adénylate de baryum réunis sont neutralisés et additionnés d'acide acétique glacial dont la concentration finale est de 2 ‰. On ajoute un excès (20 ml) d'acétate mercurique à 20 % dans l'acide acétique à 2 ‰.

Après une nuit de repos à la chambre froide, le précipité est recueilli par centrifugation, lavé avec une solution à 1 % d'acétate mercurique, remis en suspension dans 40 ml d'eau distillée, traité par H_2S gazeux, puis centrifugé.

Après 2 lavages avec une solution saturée de H_2S , le précipité mercurique est jeté, tandis que les liquides surnageants, réunis, sont débarrassés de H_2S et filtrés.

On précipite ensuite par 3 volumes d'acétone glacée et on laisse une nuit à -10° . Le précipité est recueilli ensuite, recristallisé dans le mélange eau-acétone, et le produit final desséché sur P_2O_5 .

b) Pureté et rendement

L'analyse chimique donne des chiffres correspondant bien à la formule $C_{10}H_{14}N_5O_7P$ P.M. = 347,27.

<u>Théorique</u>	<u>Trouvé</u>
P = 8,93 %	8,66 %
N = 20,17 %	19,93 %

La tache chromatographique du produit a le même RF que celui de l'acide Adénosine-5-monophosphorique de muscle ($RF_{\text{muscle}} = 0,34$ solvant II) et différent de celui de l'acide Adénosine-3-monophosphorique de levure ($RF_{\text{levure}} = 0,42$, solvant II).

1 g d'Adénosine triphosphate de baryum fournit 0 g,370 d'acide adénylique (rendement théorique 0 g,410), ce qui correspond à 90 % de la théorie.

C.- DISCUSSION DES RÉSULTATS

Ainsi, il est possible, avec une Apyrase active, exempte de phosphatase, de préparer à partir de l'ATP, non seulement le produit final de l'hydrolyse enzymatique : l'acide Adénosine-5-monophosphorique, mais également le produit intermédiaire de la réaction : l'ADP.

L'obtention de ce dernier avec un rendement élevé (70 %) démontre nettement qu'il existe un retard très prononcé de l'hydrolyse de l'ADP sur celle de l'ATP. Cet écart ne s'explique que par la forte affinité de l'enzyme pour le dernier substrat, dont la présence retarde l'hydrolyse du premier.

D'un point de vue pratique, l'Apyrase peut ainsi servir à la préparation de l'ADP et de l'AMP. Cette possibilité simplifie le travail de préparation des 3 dérivés phosphoriques de l'Adénosine. Des trois corps, l'isolement de l'ATP à partir des muscles de vertébrés est de loin le plus aisé et le plus rentable : l'extraction directe de l'ADP est de très faible rendement, celle de l'AMP est à peine meilleure. Par contre, on peut obtenir facilement 3 à 3 g,5 d'Adénosine triphosphate de baryum par kilogramme de muscle de lapin ou 2 à 2 gr,5 du même sel à partir des muscles de bétail fraîchement prélevés à l'abattoir (Cheval, Boeuf). L'emploi de

l'Apyrase permet d'obtenir les deux autres dérivés de l'A-dénosine et de compléter ainsi la gamme de donateurs et d'accepteurs de phosphates utilisés dans l'étude des métabolismes.

EXAMEN D'ENSEMBLE DES RÉSULTATS et CONCLUSIONS

Si les préparations décrites par KALCKAR, MEYERHOF et KRISHNAN ne se prêtent guère à une étude de spécificité enzymatique, la méthode de fractionnement simplifié que nous avons adoptée, nous a permis d'obtenir une Apyrase entièrement exempte d'activité sur les glycéro-phosphates, pyrophosphates et l'acide adénylique. Le rendement en produit final atteint 40 % de l'activité enzymatique initiale, et comme degré de pureté 80 % d'homogénéité protéique. Il se révèle insensible à l'action des cations divalents Ca^{++} , Mg^{++} et Mn^{++} et libère 3500 γ - 4000 γ de P par minute et par mg de N protéique dans les conditions opératoires adoptées.

Les préparations obtenues présentent des affinités très différentes vis-à-vis de l'ATP et de l'ADP : On observe en effet qu'au cours de l'hydrolyse à fortes concentrations

en substrats par une solution diluée d'Apyrase, il existe une compétition entre les deux substrats, fait déjà signalé par KALCKAR, KRISHNAN et BAILEY. Mais, contrairement à l'interprétation donnée par le premier de ces auteurs, et à un principe général admis en enzymologie, - à savoir que le produit de la réaction (ADP) inhibe l'hydrolyse du substrat initial (ATP) - l'analyse chromatographique du mélange aux différentes étapes de la réaction montre que l'ADP ne peut être déphosphorylé qu'après hydrolyse totale du groupement phosphorique terminal de l'ATP. Des traces d'ATP non décelables à la chromatographie sur papier sont cependant suffisants pour empêcher la formation d'AMP, aussi nous paraît-il que l'ATP qui gêne alors la dégradation de l'ADP.

Le décalage marqué existant entre les hydrolyses enzymatiques des deux groupements phosphoriques tend à montrer que l'Apyrase est un enzyme polyvalent dont l'affinité pour l'A.T.P. est de beaucoup supérieure à celle qu'il présente pour l'ADP. Ce point de vue est en accord avec les observations de LEE et EILER en ce qui concerne la différence d'énergie d'activation (30 fois) entre l'hydrolyse de ces deux substrats. Il se trouve, de plus, confirmé par nos propres expériences : en effet, en faisant agir l'Apyrase sur l'ATP et en arrêtant la réaction au bout de 7', nous avons pu isoler l'ADP avec un rendement égal à 70 % de la théorie; par ailleurs, en prolongeant l'action enzy-

matique sur l'ATP, nous avons pu préparer de l'acide adénylique, avec un rendement égal à 90 % de la théorie. L'obtention non seulement du produit final de l'hydrolyse enzymatique (AMP), mais aussi du produit intermédiaire de la réaction (ADP) avec un rendement élevé et à un degré de pureté satisfaisant, démontre le retard très prononcé de l'hydrolyse de l'ADP sur celle de l'ATP. Il confirme par ailleurs nettement la plus forte affinité de l'Apyrase pour l'ATP que pour l'ADP.

La possibilité d'utiliser l'Apyrase à la préparation des acides Adénosine-diphosphorique et 5-monophosphorique est une application méritant de retenir l'attention.

RÉSUMÉ

1) Une technique de purification d'Apyrase spécifique de l'ATP à partir des pommes de terre a été décrite. Elle est caractérisée par une séparation de l'Apyrase des autres phosphatases par dialyse.

- une concentration de l'enzyme par fractionnement au moyen du SO_4Am_2 ,

- une purification de l'enzyme par plusieurs précipitations avec de faibles concentrations en éthanol.

2) Dans les conditions établies les diverses préparations obtenues libèrent 3500-4000 γ P par minute et par mg de N protéique.

Soumises à l'électrophorèse Tiselius, ces préparations présentent 4 fractions, dont la principale enzymatiquement active représente 80 % de l'ensemble des protéines.

Elles sont insensibles aux ions divalents Ca^{++} , Mg^{++} et Mn^{++} (10^{-4} - 10^{-2} M).

- 3) L'étude cinétique de l'hydrolyse simultanée ou séparée des acides adénosine di (ADP) et tri-phosphorique (ATP) montre qu'il y a compétition entre ces deux substrats. L'analyse chromatographique du mélange réactionnel aux diverses étapes de la réaction révèle que cette concurrence s'exerce en faveur de l'ATP dont des traces minimes sembleraient suffisantes pour gêner la dégradation de l'ADP : celle-ci n'apparaît qu'après disparition complète du groupement phosphorique terminal de l'ATP.
- 4) Le décalage marqué des deux hydrolyses enzymatiques permet d'utiliser l'Apyrase obtenue à la préparation, avec un rendement élevé, des acides adénosine-diphosphorique et 5-monophosphorique pratiquement purs.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ALBAUM H.G. et KLETZKIN M.- Arch. Bioch. 1948, 16, 333.
- 2 - AXELROD B.- J. Biol. Chem. 1947, 167, 57.
- 3 - BAILEY K.- Bioch. J. 1942, 36, 121.
- 4 - BAILEY K.- Bioch. J. 1949, 45, 479.
- 5 - BALO J., BANGA I, JOSEPOVITZ G.- Vitamin Hormonù
Fermentforsch, 1948, 2, 1-10 ; d'après
Chem. Abst., 1949; 43, 3906 f.
- 6 - BARTH L.G. et JAEGER L.- J. cell. comp. Phys. 1947, 30,
111-30.
- 7 - BARTH L.G. et JAEGER L.- J. cell. comp. Phys. 1948, 32,
319-30.
- 8 - BARTH L.G.- Trans.N.Y. acad. Sci. (II), 1949, 2, 108-12.
d'après Chem. Abst. 1949, 43, 5477 d.
- 9 - BARRENSCHEEN H.S. et LANG S.- Bioch. Z. 1932, 253, 395.
- 10 - BERNADINES (E. de) et AURICHIO G.- Bull. Soc. Ital. Biol.
Sper. 1951, 27, 68-71.
d'après Chem. Abst. 1953, 47, 10017 g.
- 11 - BIELSCHOWSKY M.- Bioch. J. 1950, 47, 105-109.
- 12 - BOIS (du) K.P. et POTTER V.R.- J. Biol. Chem.
1943, 150, 185.

- 13 - BOLIN D.W. et ITAMBERG O.E.- Ind. Eng. Chem. Analy.
Ed. 1944, 16, 345.
- 14 - BUELL M.V.- J. Biol. Chem. 1943, 150, 389.
- 15 - CARY C.A., HARTMAN A.M.- U.S. Depart. agr. Yearbook,
1947, 779.
- 16 - CLELAND K.W.- Australian J. Exptl. Biol. med. Sci.
1951, 29, 35-45; d'après Chem. Abst.
1951, 45, 9757 f.
- 17 - COLOWICK S.P. et KALCKAR H.M.- J. Biol. chem.
1943, 148, 117-27.
- 18 - CUNHA T.J.- Ph. D. Thesis Univ. Wisconsin.
- 19 - DOUNCE A.L., ROTHSTEIN A., BEYER C.T., MEIER R. et FREER
R.M.- J. Biol. chem.; 1948, 174, 361-70.
- 20 - ENGELHARDT W.A. et LYUBIMOVA M.N.- Nature, 1939, 144, 669.
- 21 - ENGELHARDT W.A.- Yale J. Biol. and Med. 1942, 15, 21
d'après Gen. Biochemist. Fruton J.S. and
Simmonds S., édition 1953, 446.
- 22 - ENGELHARDT W.A.- Adv. in Enz. 1946, 6, 147.
- 23 - FRANK S., LIPSCHITZ R.- Cell. comp. Phys. 1949, 33, 27-40.
- 24 - FRANK S., LIPSCHITZ R. et BARTH L.G.- Arch. Bioch.
1950, 28, 207-19.
- 25 - FLEXNER J.B. et FLEXNER L.B.- J. cell. comp. Phys.
1948, 31, 311-20.
- 26 - GORE M.B.- Bioch. J. 1952, 50, 18-24.

- 27 - GEORGI C.E.- Arch. Bioch. Biophys. 1951, 31, 416-23.
- 28 - GILMOUR D.- J. Biol. Chem. 1948, 175, 477.
- 29 - HANES C.S. et ISHERWOOD F.A.- Nature, 1949, 164, 1107.
- 30 - HEPPEL L.A. et HILMOE R.J.- J. Biol. Chem. 1953, 202,
217.
- 31 - " " - Fédération Proc. 1951, 10,
196.
- 32 - HITCHINGS G.H. et FULLER H.S.- Proc. Am. Soc. Biol.
Chem. J. Biol. Chem. 1939, 128, XLV.
- 33 - JACOBSEN E.- Bioch. Z. 1931, 242, 292.
- 34 - KALCKAR H.M.- J. Biol. Chem. 1944, 153, 355.
- 35 - " " J. Biol. Chem. 1947, 167, 461.
- 36 - KERR S.E.- J. Biol. Chem. 1941, 139, 121.
- 37 - KISTRAKOWSKY G.B. et LUMBY R.- J. Am. Chem. Soc.
1949, 71, 2006.
- 38 - KORNBERG A.- J. Biol. Chem. 1950, 182, 779.
- 39 - KRISHNAN P.S.- Arch. Bioch. 1948, 16, 474.
- 40 - " " " " 1949, 20, 261-271, 272-282.
- 41 - " " Nature, 1951, 168, 171.
- 42 - " " Arch. Bioch. Biophys. 1952, 37, 224-34.
- 43 - KOTELNIKOVA A.V.- Doklady. Akad. Nauk. S.S.S.R.
1951, 78, 945-8 ; d'après Chem. Abst.
1951, 45, 10311 h.
- 44 - LEE K.H. et EILER J.J.- Science, 1951, 114, 393-95.
- 45 - LOHMANN K.- Bioch. Z., 1928, 194, 306.
- 46 - " " Bioch. Z., 1934, 271, 264.
- 47 - " " " " 1935, 282, 109.

- 48 - MAC INTIRE J.M., HENDERSON L.M., SCHWEIGERT B.S.,
ELVEHJEIN C.A.- Proc. Soc. Exptl. Biol. med. 1943, 54, 98.
- 49 - MEISTER A.- Science 1947, 106, 167.
- 50 - MEYERHOF O.- J. Biol. Chem. 1945, 157, 105.
- 51 - MEYERHOF O. et WILSON J.R.- Arch. Bioch. 1947, 14, 71.
- 52 - " " " " - J.B.C. 1949, 180, 575.
- 53 - " et GELIARKOWA N.- Arch. Bioch. 1947, 12, 405.
- 54 - " " " " - " " 1947, 13, 485.
- 55 - MULLIUS L.J.- Experientia 1949, 5, 478-9.
- 56 - MUNTZ J.A. et HURWITZ J.- Arch. Bioch. Biophys.
1951, 32, 124-137.
- 57 - NEEDHAM D.M.- Bioch. J. 1942, 36, 113.
- 58 - NGUYEN VAN THOAI.- Bull. soc. Chim. Biol. 1941, 23, 1277.
- 59 - " " " et L. de BERNARD.- C.R. des séances de
l'Académie des Sciences , 232,
1152-1154.
- 60 - OSTERN P.- Bioch. Z. 1932, 254, 65.
- 61 - PARDEE A.E.- J. Gen. Phys. 1951, 34, 619-26.
- 62 - PAGE (Le) G.A.- Bioch. Préparations vol. I. H.E.
Carter Editor.
- 63 - PRICE W.H.- J. Gén. Phys. 1947, 31, 135.
- 64 - " " " " 1949, 33, 17.
- 65 - ROCHE J., NGUYEN VAN THOAI et BAUDOUIN J.- Bull. Soc.
Chim. Bio. 1942, 24, 1247.
- 66 - ROCHE J., NGUYEN VAN THOAI et SALTMAN P.- C.R. Soc.
Biol. décembre 1950, Tome CXLIV, p. 1588.

- 67 - RAROPOORT S. et NELSON N.- J. Biol. Chem. 1945, 161, 421-7
- 68 - ROSS O.O., PHILLIPS P.H. et BOHSTEDTG G.- J. animal Sci.
1942, 1, 86.
- 69 - ROWLES S.L. et STOCKEN L.A.- Bioch. J. 1950, 47, 489.
- 70 - ROBERTS E. et CARUTHERS C.- Arch. Bioch. 1948, 16, 239.
- 71 - STEINBACH H.B.- Arch. Bioch. 1949, 22, 328-30.
- 72 - " " et MOOG.- J. Cell. Comp. Phys. 1945, 26,
175.
- 73 - SPITZER R.R. et PHILLIPS P.H.- J. nutrition 1946, 32, 631.
- 74 - SZENT GYORGYI O.- Chem. of musc. contraction N.Y. 1947.
- 75 - UTTER H.F.- J. Biol. Chem. 1950, 185, 499.
- 76 - VENKSTERN T.V.- Biokhimiya 1949, 14, 238-48 d'après
Chem. Abst. 1949, 43, 8040 c.
- 77 - WATANABE S., INNAMIYA A., NAMBA T.- Soc. Japan pure
Chem. Sect. 1952, 73, 31-35, d'après
Chem. Abst. 1952, 46, 8684 a.
- 78 - ZELLER E.A.- Arch. Bioch. 1950, 28, 138.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	
<u>SPECIFICITE' DE L'APYRASE</u>	1
A/- <u>Hydrolyse enzymatique des groupements phospho- riques labiles de l'ATP</u>	2
1) Les divers modes d'hydrolyse enzymatique de l'ATP	2
2) Les enzymes responsables de ces hydrolyses	3
B/- <u>Biochimie de l'Apyrase</u>	5
1) Caractères enzymatiques de l'Apyrase.....	5
pH optimum	6
Effecteurs	8
2) Chimie physiologique de l'Apyrase :	12
Répartition	12
Rôle - Importance de la réaction de phosphorylation couplée in vitro	16
C/- <u>Conclusion et but de recherches</u>	21
<u>RECHERCHES PERSONNELLES</u>	
<u>I - PURIFICATION DE L'APYRASE</u>	24
A/- <u>Introduction</u>	24
1) Travaux de Meyerhof	24
2) - - Kalckar	25
3) - - Krishnan	26
4) Conclusions	27

	<u>Pages</u>
B/- <u>Partie expérimentale</u>	28
1) Matériel d'étude et techniques - Mesures d'activité	28
2) Protocole de Purification	34
3) Exposés des résultats	40
Rendement	40
Activité	41
Courbes de solubilité	42
Electrophorèse	47
Effecteurs	47
C/- <u>Discussion des résultats et Conclusions</u>	50
1) Comparaison des travaux antérieurs	50
2) Conclusion	51
 <u>II - MÉCANISME D'HYDROLYSE APYRASIQUE</u>	52
A/- <u>Introduction</u>	52
1) Kalckar	52
2) Krishnan	53
3) Bailey	55
4) Lee et Eiler	56
B/- <u>Partie expérimentale</u>	59
1) Etude cinétique	59
a) Protocole d'expérience	59
b) Exposé des résultats	60
2) Analyse des produits de l'hydrolyse enzyma- tique	61
a) Protocole d'expérience. Analyse chroma- tographique	61
b) Exposé de résultats	65

	<u>Pages</u>
C/- <u>Discussion des résultats</u>	68
1) Phénomène de compétition.....	68
2) Décalage entre les 2 hydrolyses. Mise en évidence de l'ADP et l'AMP	69
3) Conclusions	69
<u>III - APPLICATIONS</u>	70
A/- <u>Introduction</u>	70
1) Méthodes connues de préparation de l'ADP	71
a) Méthode chimique	71
b) Méthode enzymatique	71
2) Méthodes connues de préparation de l'AMP	73
méthodes chimiques	73
a) A partir des tissus frais	73
b) A partir de l'ATP	76
3) Conclusions	77
B/- <u>Partie expérimentale</u>	78
1) Préparation de l'ADP	78
a) Protocole expérimentale	78
b) Pureté et rendement	79
2) Préparation de l'AMP	80
a) Protocole de préparation	80
b) Pureté et rendement	81
C/- <u>Discussion des résultats</u>	82
1) Confirmation du mécanisme d'hydrolyse enzymatique	82
2) Application pratique	82

	<u>Pages</u>
<u>EXAMEN D'ENSEMBLE DES RESULTATS et CONCLUSIONS</u>	84
I - Purification	
II - Mécanisme d'hydrolyse	
III - Applications	
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	88

Vu, le Doyen
R. FABRE

Vu, le Président de thèse
P. FLEURY

Vu et permis d'imprimer,
Le Recteur de l'Académie de Paris
Jean SARRAILH

